Table des matières

1. Introduction 1
2. Etude bibliographique 3
2.1. La tavelure du pommier 3
2.2. SDP 3
2.3. Induction de défenses 4
2.4. Potentialisation 5
2.5. Modifications épigénétiques dans la potentialisation 6
2.6. Principes de la méthodologie FAIRE 6
3. Matériels et méthodes 8
3.1. Matériels 8
3.1.1. Matériel végétal : 8
3.1.1.1. En conditions semi-contrôlées 8
3.1.1.2. Le verger 8
3.1.2. Les SDP et le peroxyde d'hydrogène 8
3.2. Méthodes 8
3.2.1. Analyses moléculaires 8
3.2.1.1. Prélèvements 8
3.2.1.2. Analyse transcriptionnelle 9
a) Extraction d'ARN et RT 9
b) qPCR 9
3.2.1.3. Analyse FAIRE-PCR 10
a) Infiltration 10
b) Vérification de l'efficacité de l'infiltration 10
c) Sonication 11
d) Vérification de l'efficacité de la sonication 11
e) Extraction d'ADN 11
f) PCR 12
3.2.2. Analyse de protection en verger 12
a) Les modalités 12
b) Observation de la tavelure 12
c) Outils d'analyse statistique 13
4. Résultats 14

4.1. Mise au point de la méthodologie FAIRE sur feuilles de pommier 14
4.1.1. Concentration de formaldéhyde 14
4.1.2. Conditions de sonication 15
4.2. Mise au point des conditions d'utilisation des amorces pour l'analyse PCR des promoteurs de gènes de défense 16
4.3. Validation de la méthodologie FAIRE-PCR 16
4.4. Sélection des échantillons potentialisés 17
4.5. FAIRE-PCR sur échantillons potentialisés 18
4.6. Effets de protection en verger 19
5. Discussion 21
5.1. Corrélation entre modifications épigénétiques et potentialisation 21
5.2. Critique de la démarche suivie 21
5.2.1. Gènes de référence 22
5.2.2. Purification d'ADN 22
5.2.3. Limites de la PCR 22
5.3. Relation entre induction de gènes de défense et efficacité de protection 23
6. Conclusion 24
Bibliographie 25

Liste des abréviations

ALLII	Alliinase
AMM	Autorisation de Mise en Marché
CAD	Cinnamyl alcool dehydrogenase
CAH	Cinnamate 4-hydroxylase
CHS	Chalcone synthase
DC	Decrosslinking
EDS1	Enhanced Disease Susceptibility 1
FAIRE	Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements
FAIRE - PCR	Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements suivie de PCR
FAIRE - Seq	Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements suivie de
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HR	Hypersensitive response
IFT	Indice de Fréquence de Traitement
JA	Acide jasmonique
LOX	Lipoxygenase
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
PFI	Protection Fruitière Intégrée
PFI al	Protection Fruitière Intégrée allégée
PR4	Pathogenesis-related protein 4
SA	Acide salicylique
SAR	Systemic Acquired Resistance
SDP	Stimulateur de défense de plantes
TuA	Tubulin alpha-1 chain

Liste des annexes

Annexe I: Liste des gènes étudiés en qPFD

Annexe II: Séquence des amorces de promoteurs des gènes de défense PR4, Alli et EDS1, et du gène de référence GAPDH

Annexe III: Observation sur gel des produits PCR obtenus en gradient de température, à partir d'ADN génomique de Golden Delicious et en utilisant les couples d'amorces ciblant les régions promotrices de gènes de défense.

Annexe IV: Schéma synthétique des couples d'amorces retenus pour l'analyse FAIRE-PCR.

Annexe V: FAIRE-PCR sur les échantillons des essais où la potentialisation s'est avérée.

Annexe VI: Pouvoir de protection contre la tavelure en verger -Première lecture sur feuilles de rosettes, 4ème passage de SDP

Annexe VII: Boîtes à moustaches comparant les effets blocs sur l'incidence de la tavelure en verger

Rapport-Gratuit.com

Liste des illustrations

Figure 1: Symptômes de la tavelure (Source : Le Cam, Orain)
Figure 2: Structure de la chromatine (modifié de Ridgway *et al.*, 2011)
Figure 3: Modifications épigénétiques impliquées dans la potentialisation. (Source : Conrath, 2011).
Figure 4: Principes de la méthodologie FAIRE (modifié de Giresi *et al*., 2007)
Figure 5: Dispositif en split splot de 3 blocs de 4 parcelles, contenant chacune 5 rangs de 13 arbres.
Figure 6: Zones amplifiées par les couples d'amorces déterminés au laboratoire
Figure 7: Calendrier de traitement contre la tavelure. Données issues des suivis de traitement au laboratoire.
Figure 8: Observation sous UV des gels d'agarose des ADN des échantillons infiltrés avec du formaldéhyde aux différentes concentrations 0%, 1%, 2% et 3%.
Figure 9: Détermination des conditions de sonication efficaces.
Figure 10: Détermination de la température d'hybridation des couples d'amorces de promoteurs de gènes de défense, exemple du couple d'amorces PR4 2 et PR4 5.
Figure 11: FAIRE-PCR sur des tissus avec et sans « decrosslinking ».
Figure 12: Traitements et prélèvements
Figure 13: Heatmap des 3 gènes de défense (PR4, Alliinase et EDS1) obtenues par RT-qPCR (qPFD) et calculées par rapport aux témoins eau et PFI al à chaque temps.
Figure 14: Analyse FAIRE-PCR des échantillons du deuxième essai en verger.
Figure 15: Boîtes à moustaches avec encoches représentant l'effet des quatre modalités de traitement sur l'incidence en tavelure.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

1. Introduction

En agriculture, la lutte contre les bioagresseurs est essentielle pour obtenir une production de quantité et de qualité. Des produits phytosanitaires classiques utilisés pour cette fin présentent cependant le problème de leur impact sur l'environnement, ainsi que sur la santé de l'homme. La recherche de nouvelles alternatives à ces produits est alors sollicitée, notamment dans le cadre du plan Ecophyto 2018. L'usage des stimulateurs de défense des plantes (SDP) en protection des cultures est une stratégie en pleine expansion à l'heure actuelle, car ils pourraient participer à la réduction de l'usage des pesticides. Les SDP sont des molécules induisant des réactions de défense chez le végétal, qui devient alors plus résistant aux maladies. Ils peuvent être synthétiques ou naturels, et dans ce dernier cas, sont d'origines diverses (plantes, animaux, microorganismes). Contrairement aux produits classiques, ils n'ont pas, pour la plupart, d'action biocide directe sur les bioagresseurs visés, ni plus généralement sur la flore et la faune. L'équipe Respom qui est l'équipe d'accueil de ce stage, mène des études sur l'efficacité et le mode d'action des SDP. Ces recherches sont menées principalement sur le pommier.

La France est le deuxième producteur européen de pommes et ce fruit représente la première production fruitière française. Face aux multiples bioagresseurs qui peuvent l'attaquer, l'IFT (Indicateur de Fréquence de Traitement) du pommier est élevé, et les produits phytosanitaires prennent une part importante dans le budget de production de pommes. Notre étude portera sur cette culture, en se focalisant sur le pouvoir d'un SDP particulier dans la lutte contre la tavelure, maladie dont l'impact économique est le plus important pour les arboriculteurs. De précédentes études du laboratoire d'accueil ont en effet mis en évidence l'efficacité de protection de ce SDP sur pommier, en conditions contrôlées, vis-à-vis de cette maladie. Le nom du produit restera confidentiel et sera codé « SDP X » dans tout le rapport.

Les SDP peuvent induire certains gènes de défense directement après traitement, mais cette action présente un coût de fitness. En revanche, certains produits ont l'avantage de conduire à une expression forte et rapide de certains gènes de défense, uniquement à la suite d'un stress secondaire. Ce phénomène appelé « potentialisation » réduit les coûts de fitness de la plante. Les mécanismes régissant cette « potentialisation » doivent être étudiés afin de mieux profiter de ses avantages.

En amont, des études sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ont montré que la potentialisation est régulée par des mécanismes épigénétiques, c'est-à-dire des processus qui influent sur l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN. Plus précisément, il s'agit de la modification de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes de défense (Conrath, 2011). Ces modifications libèrent la chromatine libre au niveau des promoteurs de gènes de

défense, ce qui facilite leur transcription ultérieure. La séparation d'éléments régulateurs assistée par le formaldéhyde (FAIRE) est une méthode qui permet d'obtenir cette chromatine libre, pour pouvoir étudier les modifications épigénétiques.

L'objectif du travail a été de vérifier si ce mécanisme épigénétique prend place dans la potentialisation du pommier, *Malus x domestica,* traité par le SDP X.

Pour ce faire,

- Il a fallu en premier lieu mettre au point la méthodologie FAIRE sur pommier.
- En parallèle, il a été nécessaire de préparer et sélectionner des échantillons potentialisés ou non : la vérification de la potentialisation a été réalisée par RT-qPCR sur quelques gènes de défense à partir d'expériences réalisées en conditions contrôlées et en verger, sur des tissus foliaires traités au SDP avec ou sans stress secondaire.
- Sur les échantillons sélectionnés, l'analyse des modifications au niveau des promoteurs de gènes a été réalisée, en appliquant la méthodologie FAIRE, suivie de PCR sur quelques gènes sélectionnés.

Enfin, en marge de ce travail, j'ai pu participer à l'expérimentation en verger de 2 SDP incluant le SDP X. Les résultats de protection obtenus vis-à-vis de la tavelure sont donc également rapportés dans ce travail.

(A) **(B)** **(C)**

Figure 1: Symptômes de la tavelure (Source : Le Cam, Orain)

(A) Tâches brunes sur fruits. Taches brunes sur la face supérieure (B) et la face inférieure (C) des feuilles de pommier.

2. Etude bibliographique

2.1. La tavelure du pommier

La tavelure est une des principales affections fongiques du pommier. La maladie tue rarement son hôte mais a un impact économique important, du fait qu'elle peut réduire significativement (jusqu'à 100 %) la qualité et la production des fruits et les rend impropres à la commercialisation. Elle est causée par un champignon ascomycète nommé *Venturia inaequalis* et est rencontrée dans le monde entier. Les pommiers affectés présentent des lésions noires ou brunes à la surface des feuilles, des bourgeons ou des fruits et parfois même sur le bois. Ces symptômes sont illustrés dans la figure 1 ci-contre. Un climat humide au moment du débourrement permet une grande diffusion des spores du champignon et favorise la maladie. Une infection primaire par les ascospores peut conduire à la production d'inoculum secondaire sous forme de conidies qui seront à l'origine de contaminations secondaires. La protection phytosanitaire vis-à-vis de la tavelure peut représenter jusqu'à 50% des traitements en verger (CTIFL, 2002). C'est pourquoi cette maladie a été ciblée par l'équipe Respom pour observer l'efficacité de protection des SDP en verger.

2.2. SDP

Le mode d'action des SDP est d'induire des réactions de défense chez le végétal, incluant notamment la production de molécules de différentes natures, toxiques pour les bioagresseurs ou freinant leur progression. Ces intrants peuvent être synthétiques ou d'origine naturelle (plantes, animaux, microorganismes). Ils n'ont pas d'action directe sur les bioagresseurs, et sont considérés comme plus respectueux de l'environnement (Benhamou & Rey, 2012). Ils sont cependant régis par la même réglementation que les produits phytopharmaceutiques (directive 91/414/CEE) et font face aux procédures d'homologation et d'AMM longues et coûteuses qui freinent le développement de leur utilisation.

Un SDP doit en théorie respecter trois conditions pour être considéré comme tel: ne pas avoir d'activité antimicrobienne directe, permettre une protection contre un large spectre d'agents pathogènes (sans spécificité) et activer les mécanismes de défenses de la plante (Globowski, 2008). Si les SDP démontrent une efficacité de protection en conditions contrôlées, ils sont généralement reconnus pour n'avoir qu'une efficacité partielle et souvent aléatoire au champ. Cette efficacité est parfois suffisante pour réduire les traitements phytosanitaires classiques, mais trop faible pour les remplacer complètement (Beckers & Conrath, 2007). L'intérêt technique et environnemental de ces produits incite à plus de recherches pour l'optimisation de leur utilisation.

Parmi les SDP étudiés au laboratoire, le SDP X a démontré une efficacité de protection significative pour lutter contre la tavelure sur des semis et scions de pommier en serre. L'efficacité de protection contre la tavelure en verger a également été observée mais doit être confirmée (Brisset, Communication personnelle).

2.3. Induction de défenses

Face aux multiples bioagresseurs, les plantes disposent de mécanismes de défenses variés. Elles ont des défenses constitutives, qui sont présentes en permanence (comme la cuticule et la paroi cellulaire), et des défenses induites qui se déclenchent lorsque les bioagresseurs parviennent à franchir ces premières. Les plantes sont capables de percevoir la majorité des bioagresseurs et répondent par des mécanismes de défenses locales pour éviter le développement de la maladie. Cette réponse se traduit souvent par une mort des cellules au point d'infection, caractéristique de ce qui est qualifiée de réaction d'hypersensibilité (HR). Pour se protéger des agressions futures, les plantes peuvent aussi induire les défenses dans les parties non infectées. Il s'agit de la résistance systémique acquise (SAR). La reconnaissance des bioagresseurs déclenche une émission de signaux d'alerte dans l'ensemble de la plante grâce à une cascade de réactions impliquant différentes voies de signalisation, notamment les voies de signalisation de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène. L'induction de ces voies de signalisation aboutit à la synthèse de composés à action biocide (comme les « Pathogenesis-Related » protéines ou PR protéines, les phytoalexines,…) ou impliqués dans le renforcement pariétal.

La perception des attaques des agents pathogènes biotrophes est plus généralement caractérisée par l'activation en aval de défenses SA-dépendantes, tandis que la détection de stress biotiques comme les attaques d'insectes herbivores ou agents pathogènes necrotrophes, ou abiotiques comme des blessures quelconques, est plutôt associée à l'activation de défenses JA-dépendantes (Thaler *et al*, 2012).

La voie SA-dépendante commence par la synthèse de l'acide salicylique à partir de protéines précurseurs comme EDS1 (Wiermer *et al.*, 2005). L'accumulation locale et systémique d'acide salicylique est corrélée à l'induction précoce des gènes de facteurs de transcription WRKY qui jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité des plantes. La voie JA-dépendante débute par la synthèse de l'acide jasmonique à partir d'oxydation des phospholipides membranaires par des lipoxygénases (LOX) (Devoto & Turner, 2005). L'éthylène est reconnu comme un modulateur indispensable de certaines voies, et notamment celle de l'acide jasmonique. Son précurseur principal est la S-adénosine-L-méthionine qui dérive du métabolisme de synthèse des acides aminés soufrés (méthionine, homocystéine et cystéine) (Bleecker *et al.*, 2000 ; Ma *et al.*, 2006).

Rapport-Gratuit.com

A cause des intéractions complexes qui existent entre ces voies, les défenses en aval ne peuvent être classées dans une voie spécifique. Parmi ces défenses, on distingue les PR protéines ou « Pathogenesis-Related » protéines qui sont, comme leur nom l'indique, des protéines liées à la pathogénicité. Elles se distribuent au sein de dix-sept familles (Christensen *et al.* 2002) et leurs fonctions sont variées (activité antimicrobienne, renforcement pariétal, inhibition de facteurs du pouvoir pathogène des bioagresseurs,…), voire encore inconnues (Bertini *et al.* 2009).

Des voies secondaires participent aussi aux défenses de la plante. On distingue les voies des métabolismes secondaires des phénylpropanoïdes (PAL et CAH) et des flavonoïdes (CHS), et de synthèse de lignine ou de polysaccharides pour le renforcement pariétal (CAD, peroxydases, callose synthase). La voie des isoprénoïdes ou terpénoïdes synthétise des composés rendant les plantes toxiques ou indigestes pour les herbivores. La voie des cystéines sulfoxides conduit à des métabolites secondaires identifiés initialement chez l'ail comme l'allicine qui a des propriétés antibactériennes. L'allicine est issue de l'hydrolyse de l'alliine par l'alliinase. Des études suggèrent que cette enzyme est présente chez le pommier et qu'elle participe aux mécanismes de défense (Dugé de Bernonville, 2009).

Comme dans l'établissement de la SAR, le traitement avec un SDP peut induire les voies de signalisation des défenses aboutissant à l'activation de gènes de défenses chez la plante. La plupart des études caractérisent la stimulation des défenses des plantes par le suivi de l'expression de gènes marqueurs de défense codant des protéines PR (Pathogenesis Related), des protéines impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires ou encore des molécules intervenant dans les voies de signalisation hormonale impliquant l'acide salicylique, l'acide jasmonique ou l'éthylène.

Les gènes utilisés dans l'étude de l'effet d'induction des SDP au cours de ce travail sont listés en Annexe I, avec les classes de fonction auxquelles ils s'apparentent.

2.4. Potentialisation

La potentialisation des défenses se distingue de l'activation directe des défenses. Pouvant être provoquée par une application exogène de traitements chimiques, la potentialisation provoque chez la plante des réponses de défense plus rapides et/ou plus fortes après un stress biotique ou abiotique ultérieur (Conrath, 2011 ; Jaskiewicz, 2011). En d'autres termes, les produits potentialisateurs déclenchent seulement les premières étapes de la résistance induite pour placer la plante dans un état d'alerte. En cas d'attaque par un agent pathogène, les molécules de défense seront synthétisées à des concentrations plus élevées, la réponse sera plus rapide et plus efficace. La potentialisation permet à la plante d'allouer toutes ses ressources pour la croissance et la production, car la dépense énergétique de la plante pour sa défense est limitée à la période d'agression.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

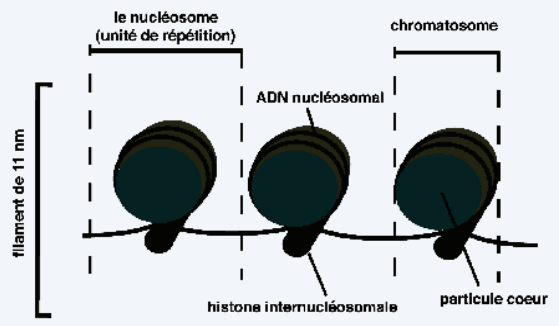


Figure 2: Structure de la chromatine (modifié de Ridgway *et al.*, 2011)

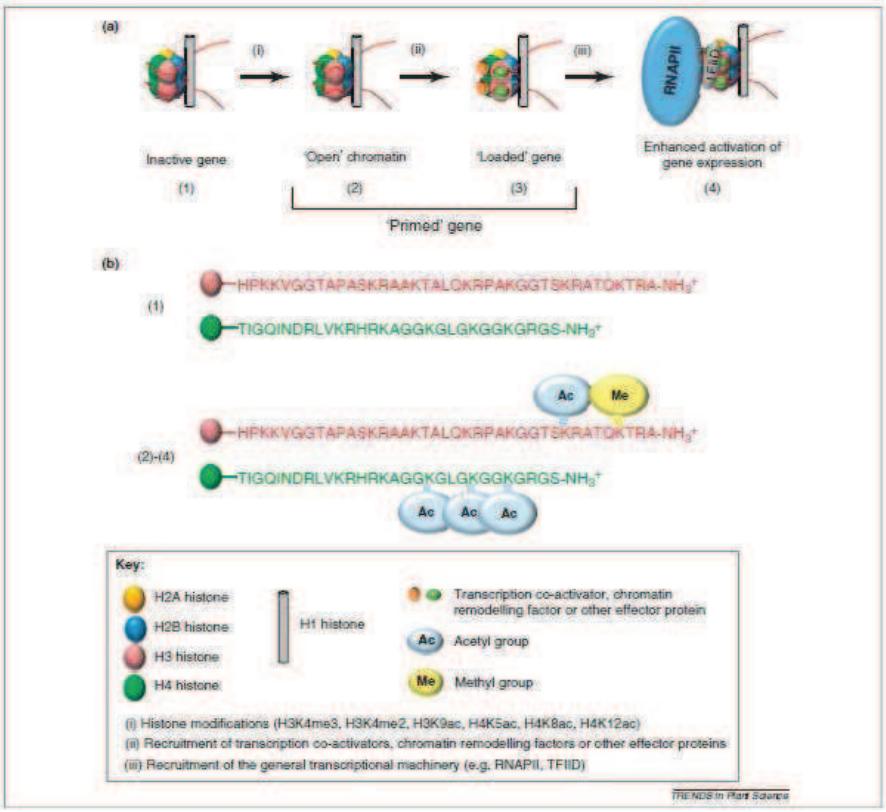


Figure 3: Modifications épigénétiques impliquées dans la potentialisation. (Source : Conrath, 2011).

a)Les 146 paires de bases de l'ADN sont enroulées autour de l'octamère d'histones H2, H2B, H3 et H4. Les gènes sont transcriptionnellement inactifs dans cet état. Un traitement incitant une potentialisation provoque des modifications covalentes au niveau des histones, qui réduisent l'interaction ionique de l'histone avec l'ADN et produit une chromatine ouverte et/ou des sites d'accueil pour les régulateurs de transcription. Les gènes concernés sont alors préparés et lors d'un stress, leur expression est modifiée selon l'accessibilité des éléments de transcription comme le RNA polymérase II et le facteur de transcription TFIID. b) Description des modifications de la chromatine impliqués dans 1 à 4. La chromatine inactive (b-1) subit des méthylations et acétylation des lysines 4 et 9 de l'histone H3, et des acétylations des lysines 5, 8 et 12 de l'histone H4.

Des études trancriptionnelles effectuées avant mon arrivée ont montré que certains gènes de défense sont potentialisés par le SDP X dans les feuilles néoformées de semis de Golden, prélevées 9 jours après traitement. Par contre, sur scions de la variété Gala, cette potentialisation s'observe directement sur les jeunes feuilles traitées, prélevées 2 jours après traitement avec ce même SDP (Brisset, Communication personnelle).

2.5. Modifications épigénétiques dans la potentialisation

La potentialisation est étroitement liée à la modification de la chromatine (Conrath, 2011). Pour mieux l'expliquer, il faut d'abord comprendre la structure de la chromatine. Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine. Il est composé d'une particule cœur et d'une région de liaison (ou région internucléosomale) qui relie les particules coeurs adjacents (Figure 2). La particule cœur, dont la structure est très conservée parmi les espèces, est composée de 146 paires de bases d'ADN enroulées selon environ 1,7 tours autour d'un octamère protéique comprenant deux exemplaires de chacune des histones H3, H4, H2A et H2B (Jaskiewicz *et al.*, 2010 ; Ridgway *et al.*, 2002).

Un traitement induisant la potentialisation provoque des modifications covalentes sur les histones positionnées au niveau des promoteurs de gènes de défense. Il s'agit la plupart du temps de méthylation et d'acétylation des extrémités N-terminales des histones H3 et H4 (Figure 3). Ces modifications réduisent l'interaction ionique de l'histone avec l'ADN et produisent une chromatine ouverte et/ou des sites d'accueil pour les co-activateurs de transcription et les facteurs de remodelage de la chromatine. Cela modifie le niveau d'expression du gène situé en aval de ce promoteur (Conrath, 2011).

2.6. Principes de la méthodologie FAIRE

FAIRE ou Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements est une méthodologie utilisée en biologie moléculaire pour isoler et étudier la chromatine libre. Elle peut être expliquée en quatre étapes, illustrées sur la figure 4. D'abord, une infiltration au formaldéhyde permet de fixer les liaisons ioniques entre l'ADN et les protéines par un phénomène appelé « crosslinking ». Ensuite, une sonication permet d'obtenir des fragments d'ADN de quelques centaines de paires de bases puis une extraction au phénol-chloroforme permet d'isoler la chromatine libre dans la phase aqueuse, tandis que les fragments d'ADN piégés par les liaisons ADN-protéines sont retenus à l'interface. A la fin, l'ADN solubilisé dans la phase aqueuse est précipité (Nagy & Price, 2009 ; Simon *et al*, 2013).

La fixation des liaisons ADN-protéine par l'infiltration de formaldéhyde est stable mais réversible à la chaleur. Un passage des échantillons à l'étuve à 60°C permet de défaire l'ensemble des liaisons et de récupérer tout l'ADN durant la phase d'extraction au phénol-

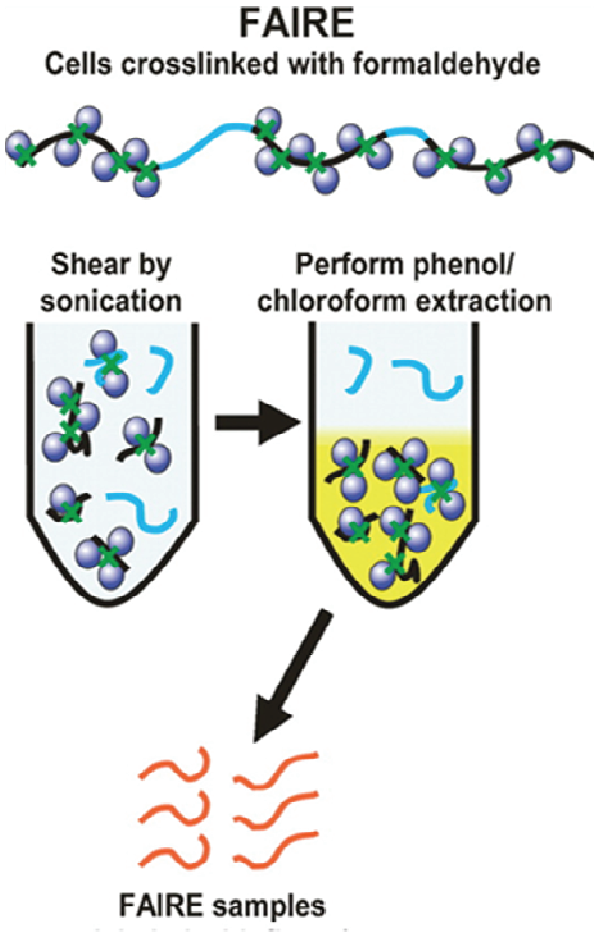


Figure 4: Principes de la méthodologie FAIRE (modifié de Giresi *et al*., 2007)

La fixation du formaldéhyde permet de créer des liens protéines-ADN. Cette chromatine est ensuite soniquée pour obtenir des fragments de la taille étudiée. Durant l'extraction de l'ADN au phénol-chloroforme, la chromatine libre (non liée aux protéines) est récupérée.

chloroforme. Ce principe permet de vérifier l'efficacité de la fixation du formaldéhyde par l'intermédiaire d'une électrophorèse des ADN extraits avec ou sans passage à 60°C. L'ADN génomique doit être récupéré seulement dans l'échantillon où les liens ont été défaits (Haring, 2007 ; Nagy & Price, 2009).

La chromatine libre obtenue peut être analysée de manière globale en séquençage, ou par puce à ADN, ou de manière plus ciblée par PCR afin d'identifier les régions significativement enrichies. Les informations obtenues permettent d'améliorer la compréhension sur le paysage nucléosomique et la régulation de la structure de la chromatine.

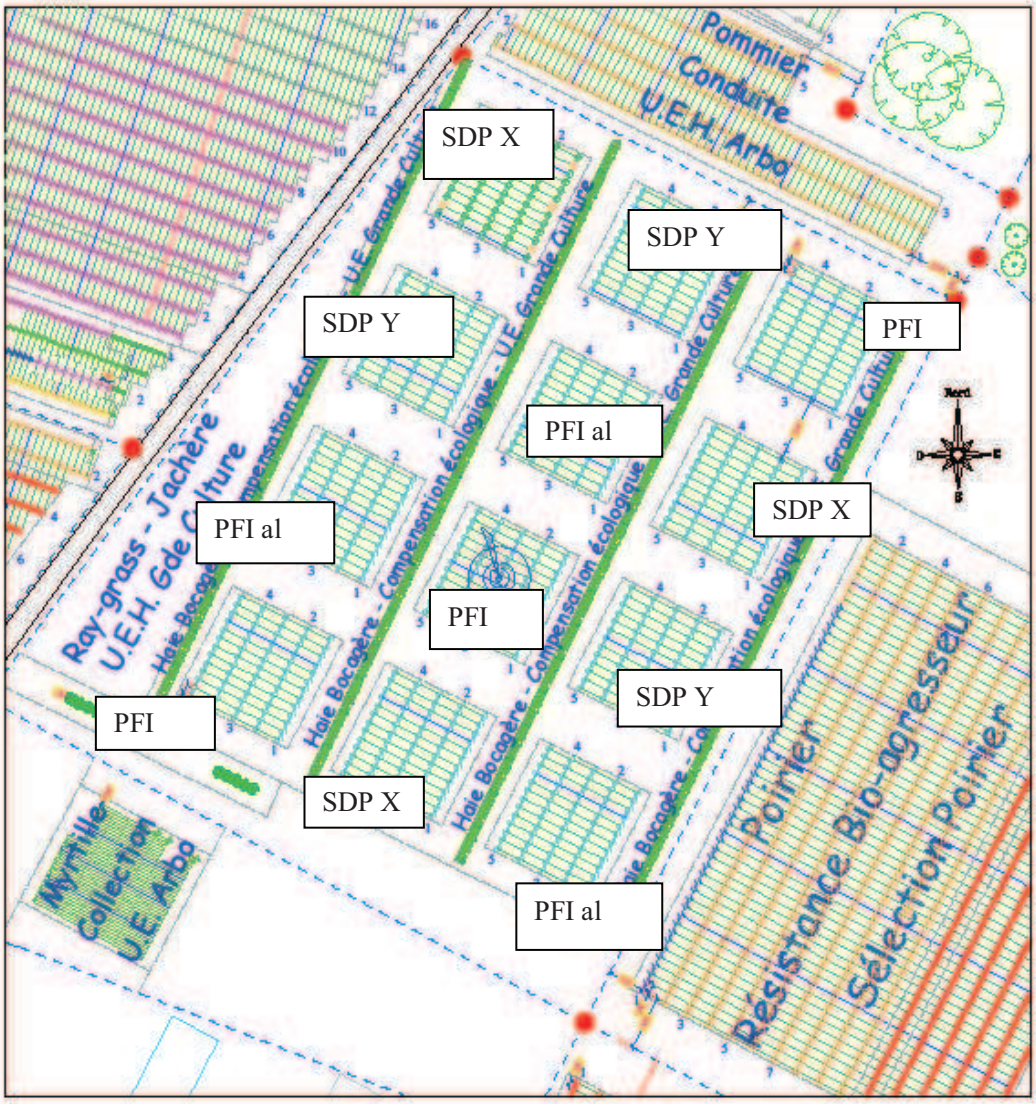


Figure 5: Dispositif en split splot de 3 blocs de 4 parcelles, contenant chacune 5 rangs de 13 arbres.

La **PFI** ou **Protection Fruitière Intégrée** est la méthode de protection habituelle des parcelles de l'unité expérimentale de l'INRA. Elle s'appuie sur des observations en verger et sur le modèle Pulsowink Professionnel pour déterminer les risques d'infection (faible, moyen ou fort), à partir des prévisions de température, d'humectation et d'hygrométrie. Il y a intervention dès que le risque est faible.

• La **PFI al** ou **Protection Fruitière Intégrée allégée** suit les mêmes principes que la PFI, mais avec des seuils d'intervention uniquement pour les risques d'infection élevés.

Dans les modalités **SDP X** et **SDP Y**, les traitements sont les mêmes que dans la modalité PFI al, mais avec l'application respective de SDP X et SDP Y en plus, pulvérisés à la cadence d'une fois par semaine pendant toute la période de croissance des pousses (du 10 avril au 18 juin 2013).

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Matériel végétal :

3.1.1.1. En conditions semi-contrôlées

Le matériel végétal utilisé en conditions semi-contrôlées comprend des semis et des scions, cultivés en pots individuels en serre à des températures d'environ 22 -25°C°C le jour et 18°C la nuit. La photopériode et l'éclairage sont naturels, bien qu'un éclairage artificiel soit utilisé en complément lors de faible luminosité.

Les plantes sont soit des semis de la variété Golden Delicious issus de pollinisation libre, utilisés au stade 3 à 6 feuilles, ou des scions de la variété Gala en croissance active, greffée sur le porte-greffe MM106.

Les semis et scions nécessaires sont sélectionnés au moins la veille de la mise en place d'un essai pour permettre leur acclimatation aux grandeurs physiques de l'enceinte et minimiser les effets de stress lié à leur déplacement.

3.1.1.2. Le verger

Le verger dédié à l'étude des SDP (effet protecteur et analyse moléculaire) est constitué par des arbres de la variété Golden Reinders®. Il est organisé selon un dispositif en split splot de 3 blocs de 4 parcelles, contenant chacune 5 rangs de 13 arbres (Figure 5) et permet donc la comparaison de 4 modalités de traitements

3.1.2. Les SDP et le peroxyde d'hydrogène

SDP X est une formulation constituée de granulés dispersibles dans l'eau renfermant 50% de matière active. Pour une application en conditions semi-contrôlées, une quantité de 500 ml de SDP X est préparée à la concentration optimale (0,4g/l), en diluant le produit dans de l'eau osmosée. L'application est faite jusqu'à ruissellement avec un pulvérisateur à air comprimé.

En verger, les SDP sont pulvérisés à la dose de 0,15kg/ha pour SDP X et 2kg/ha pour SDP Y.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est appliqué en conditions semi-contrôlées et en verger à une concentration de 0,15%, par pulvérisation manuelle jusqu'à ruissellement.

3.2. Méthodes

3.2.1. Analyses moléculaires

3.2.1.1. Prélèvements

Pour les analyses transcriptionnelles sont prélevées 2*10 disques foliaires de 6 mm de diamètre à partir d'un pool de 5 plus jeunes feuilles développées de 5 semis ou 5 pousses de

scions ou d'arbres, immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à analyse. Pour l'analyse FAIRE-PCR, les prélèvements consistent en pool de 10 feuilles entières, d'âge similaire, immédiatement utilisées.

3.2.1.2. Analyse transcriptionnelle

L'analyse transcriptionnelle comprend une extraction d'ARN, une rétro-transcription (RT) et une PCR quantitative (qPCR).

a) *Extraction d'ARN et RT*

Le protocole d'extraction utilisé (Venisse *et al.,* 2002) repose sur une précipitation des ARN au LiCl et un traitement à la DNAse suivi d'une purification finale au phénol-chloroforme. L'ARN est dosé avec un spectrophotomètre (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, Thermo SCIENTIFIC, Wilmington, Delaware, Etats-Unis). La RT, ainsi que la vérification de la présence d'ADNc non contaminés par de l'ADN génomique, suivent également le protocole de Venisse *et al.* (2002).

b) *qPCR*

La qPCR SYBR®Green a pour but d'amplifier et de quantifier en temps réel les produits PCR grâce à la mesure de la fluorescence du SYBR® Green, fluorophore qui s'intercale entre les doubles brins d'ADN.

La qPFD (Puce Faible Densité quantitative) est une technique mise au point par l'équipe Respom qui permet de suivre l'expression de 28 gènes de défense (Annexe I) dans un échantillon (Brisset *et al.*, 2011a ; Marolleau *et al.*, 2013). Il s'agit d'une plaque de 96 puits contenant en triplicat sous forme déshydratée des couples d'amorces de ces 28 gènes, ainsi que ceux de trois gènes de référence (TuA, Actin, GAPDH) qui permettent de normaliser les expressions des 28 gènes d'un échantillon à l'autre.

Pour chaque plaque, on réalise un mix qPCR avec 1115µl d'eau ultra-pure stérile, 375 µl de Mesablue (Eurogentec, Seraing, Liège, Belgique), et 10 µl d'ADNc de l'échantillon à étudier. Le mix est ensuite réparti à la pipette multidistributrice à raison de 15µl par puits. La qPCR est réalisée sur iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) selon un programme comportant une activation de la « DNA polymérase » de 8mn à 95°C, puis 40 cycles de 10s à 95°C et 30s à 60°C.

En fin de qPCR, le logiciel Iq™ Optical System Software Version 2.0 (Bio-Rad) fournit des valeurs de Ct (threshold cycle ou cycle seuil) pour chaque puits où il y a eu amplification. Le Ct est défini comme le nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'un signal supérieur au bruit de fond, pour chaque puits. Le bruit de fond correspond aux fluctuations de fluorescence présentes avant la phase exponentielle d'amplification. Les niveaux d'expression relative sont alors calculées selon la méthode du ΔΔCt (Livak&Schmittgen, 2001) : il s'agit d'expressions relatives

Rapport-Gratuit.com

calculées par rapport à un calibrateur (échantillon non traité prélevé à J0 ou échantillons « eau » prélevés à chaque temps par exemple) et normalisées par la moyenne géométrique des expressions relatives des trois gènes de référence (leur stabilité étant vérifiée selon la méthode de Vandesompele et *al.* (2002)). Ces expressions relatives sont enfin transformées en $\log_2$ pour donner le même poids aux inductions et aux répressions des gènes.

Les résultats sont représentés sous forme de carte de densité (heat map) qui représente en couleurs rouges les induction et en bleues les répressions des différents gènes dans chaque échantillon. La *heatmap* se fait par mise en forme conditionnelle sous Excel.

3.2.1.3. Analyse FAIRE-PCR

Le protocole utilisé est la première partie du protocole d'immunoprécipitation de la chromatine décrite par Haring *et al.*, 2007.

a) *Infiltration*

Les feuilles fraîches sont plongées dans 30ml de tampon A (Tris 10mM pH 8.0, saccharose 400mM, PMSF 0,1mM, ß-mercaptoéthanol 5mM, tween 0,1%, et formaldéhyde à la concentration adaptée), et infiltrées sous vide pendant 10mn. Un volume de 2,5ml de glycine 2M est ensuite rajouté et infiltré pendant 5 mn pour neutraliser l'action du formaldéhyde. Après trois rinçages à l'eau sous la hotte, les feuilles sont broyées en poudre fine avec de l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue est mise à agiter pendant 15mn à 4°C, dans 30ml de tampon B (Tris 10mM pH 8.0, saccharose 400mM, PMSF 0,1mM, ß-mercaptoéthanol 5mM). La solution est filtrée à travers deux filtres de 500µm et 50µm, et le filtrat est centrifugé à 2880g à 4°C pendant 20mn. Le culot est resuspendu dans 1ml de tampon C (Tris 10mM pH 8.0, saccharose 250mM, $MgCl_2$ 10mM, triton 1% v/v -x100e, PMSF 0,1mM, ß-mercaptoéthanol 5mM, inhibiteur de protéinase 1µg/ml) et centrifugé à 12000g à 4°C pendant 10mn. Le culot resuspendu dans 300µl de tampon D (Tris 10mM pH 8.0, saccharose 1,7M, $MgCl_2$ 10mM, Triton 0,15%, PMSF 0,1mM, inhibiteur de protéinase 1µg/µl) et cette solution est mise par-dessus 1500µl de tampon D. Le tout est centrifugé à 16000g à 4°C pendant 1heure. Le surnageant est retiré et le culot est suspendu dans 320µl de tampon pour la lyse des noyaux (Tris 50mM pH 8.0, EDTA 1mM, SDS 0.4% w/v, PMSF 0,1mM). Un aliquot de 20µl de cette solution est prélevé ; celui-ci représentera la chromatine entière pendant la vérification.

b) *Vérification de l'efficacité de l'infiltration*

Deux solutions sont préparées avec 10µl de chromatine entière, 140µl de TE (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 1mM), 5µl de NaCl 5M, et 10µl de SDS 10%. Un des deux tubes est mis une nuit dans une étuve à 60°C pour défaire les liens protéine-ADN, c'est le « decrosslinking » qu'on va abréger par +DC dans la suite du rapport. Une extraction d'ADN par la méthode de purification au phénol-chloroforme est ensuite effectuée sur les deux tubes, et l'ADN précipité à l'éthanol

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MEMOIRES

sera conservé dans 20µl de TE. L'efficacité de la fixation au formaldéhyde est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose (présence d'ADN que dans l'échantillon +DC).

c) *Sonication*

Une sonication à une amplitude définie et avec des conditions de cycles adaptées (temps d'un cycle comprenant un temps de sonication et un temps de pause) est effectuée pour obtenir des fragments de la taille entre 150 et 750 paires de bases. Pour cela, les tubes de 2ml contenant les solutions issues des étapes précédentes sont installés sur un portoir en mousse, et déposés dans le réceptacle de l'appareil sonicateur (Sonopuls, Bandelin) contenant de l'eau refroidie (pour éviter l'échauffement des tubes et de leurs contenus) avec un peu de liquide vaisselle (pour réduire les tensions de surface).

d) *Vérification de l'efficacité de la sonication*

Les solutions soniquées sont centrifugées à 13000g à 4°C pendant 5mn. Le surnageant contient la chromatine soniquée. Deux solutions sont préparées, avec respectivement 10µl de chromatine entière et 10µl de chromatine soniquée, 140µl TE (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 1mM), 5µl de NaCl 5M, et 10µl de SDS 10%. Les deux tubes sont mis une nuit dans une étuve à 60°C pour casser les liaisons induites par le formaldéhyde. Une extraction d'ADN au phénol chloroforme est ensuite effectuée sur les deux tubes, et l'ADN précipité à l'éthanol sera conservé dans 20µl de TE. L'efficacité de la sonication est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour une sonication efficace, on récupère de l'ADN génomique dans l'échantillon non soniqué contre des fragments entre 150 et 750 paires de bases dans l'autre.

e) *Extraction d'ADN*

A l'issue de la lyse, un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique est ajouté et mélangé à l'ensemble afin d'obtenir une suspension laiteuse. Après centrifugation à 13000 g pendant 10 minutes, la phase aqueuse supérieure est récupérée à l'aide d'une pipette et réservée dans un nouveau tube. Dans le but de récupérer le maximum de matériel, on rajoute 200µl et une nouvelle extraction au phénol/chloroforme / alcool isoamylique est réalisée. La phase aqueuse supérieure ainsi obtenue est ajoutée à la première récupération. Le mélange est vortexé après ajout d'un volume de chloroforme, et centrifugé 10mn à 13000g. La phase supérieure est récupérée dans un nouveau tube de 2ml. Les acides nucléiques sont précipités en ajoutant 1/10 du volume d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol absolu, suivi d'un temps de pause d'au moins 30mn à -80°C. Le tout est centrifugé à 13000g pendant 20mn à 4°C, et le culot est lavé à l'éthanol à 70% puis séché sous la hotte pendant 10mn. La pelote d'ADN est ensuite re-suspendue dans 100µl de TE (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 1mM) et peut être conservée à -80°C.

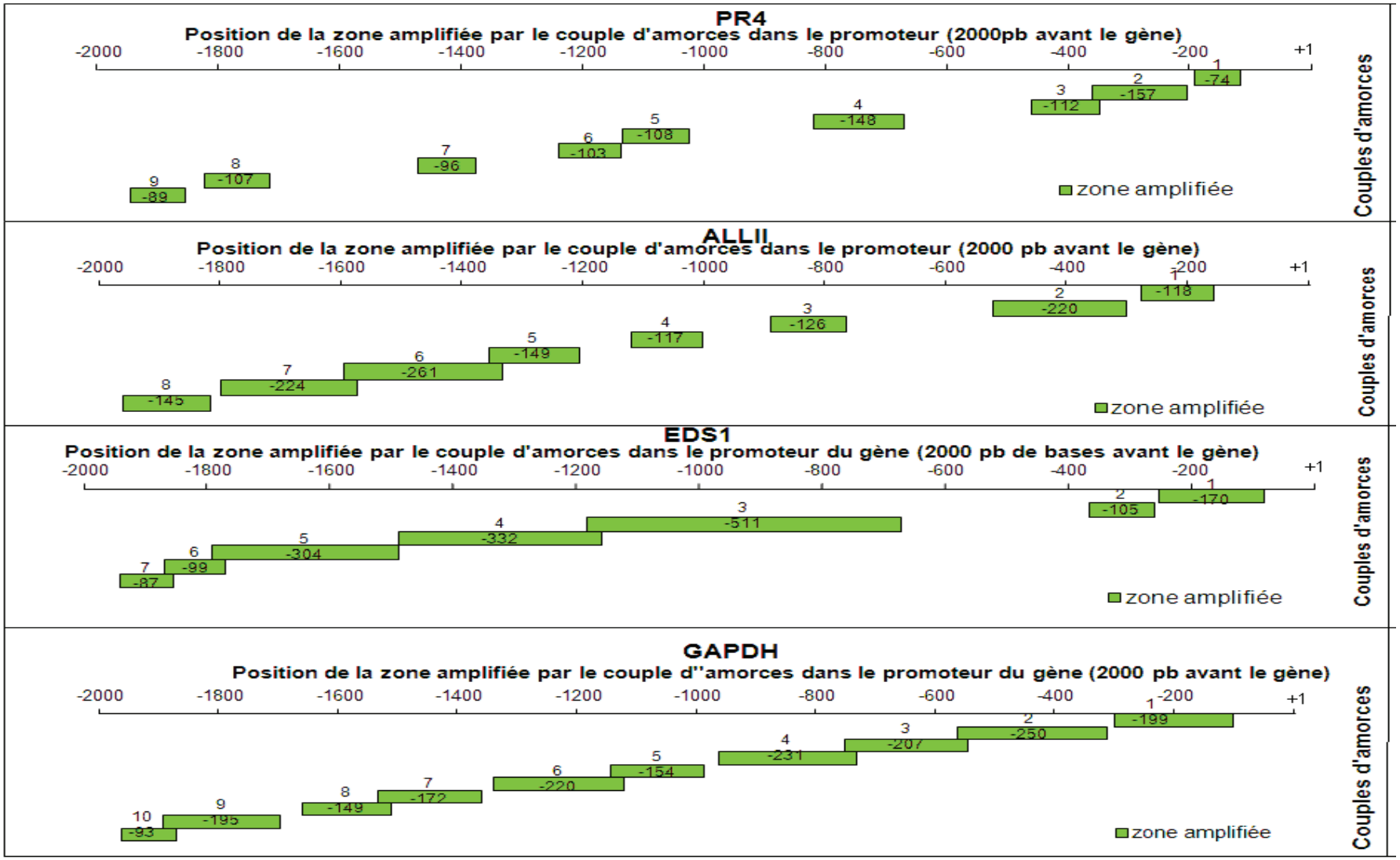


Figure 6: Zones amplifiées par les couples d'amorces déterminés au laboratoire

f) *PCR*

Les PCR sur ADN sont réalisées avec les amorces des promoteurs des gènes de défense PR4, Alliinase et EDS1 et du gène de référence GAPDH. Pour chacun des gènes concernés, 7 à 10 couples d'amorces ont été dessinés (Annexe II), de façon à amplifier dans la mesure du possible les différentes portions de la région de 2000 paires de bases en amont du codon start (Figure 6).

Pour chaque amplification, le mélange suivant est préparé : 12,8µl d'eau ultra-pure, 4µl de tampon Taq (5X), 1,2µl de $MgCl_2$ (25mM), 0,5µl de dNTP (2,5mM), 0,05µl de GoTaq®Flexi ADN Polymérase (Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis), 2µl du mélange d'amorces directe et reverse (10µM pour chacune), et 1µl d'ADN dilué à 100ng/µl. La réaction est exécutée en thermocycleur Primus 96^{plus} (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne). Les produits PCR sont stockés à 4°C jusqu'à leur séparation sur gel d'agarose 2%. Le marqueur de taille utilisé est le GelPilot® 50pb Ladder (100) (QIAGEN Group). La révélation est visualisée par marquage au bromure d'éthidium (BET, 0,5mg/l) à l'aide d'une caméra pilotée par le logiciel Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis).

3.2.2. *Analyse de protection en verger*

a) *Les modalités*

Quatre modalités de traitements contre la tavelure y sont réalisées, chacune étant répétée 3 fois et répartie d'une façon aléatoire selon le plan de parcelle en Figure 5.

• La **PFI** ou **Protection Fruitière Intégrée** est la méthode de protection habituelle des parcelles de l'unité expérimentale de l'INRA. Elle s'appuie sur des observations en verger et sur le modèle Pulsowink Professionnel pour déterminer les risques d'infection (faible, moyen ou fort), à partir des prévisions de température, d'humectation et d'hygrométrie. Il y a intervention dès que le risque est faible.

• La **PFI al** ou **Protection Fruitière Intégrée allégée** suit les mêmes principes que la PFI, mais avec des seuils d'intervention uniquement pour les risques d'infection élevés.

Dans les modalités **SDP X** et **SDP Y**, les traitements sont les mêmes que dans la modalité PFI al, mais avec l'application respective de SDP X et SDP Y en plus, pulvérisés à la cadence d'une fois par semaine pendant toute la période de croissance des pousses (du 10 avril au 18 juin 2013).

Le calendrier de ces traitements anti-tavelure est schématisé dans la figure 7.

b) *Observation de la tavelure*

L'incidence de la maladie a été notée sur 4 pousses (choisies aléatoirement à chaque lecture) sur chaque arbre du 3ème rang (à l'exception des arbres de bordure) de chaque parcelle. Pour chaque pousse, l'incidence correspond au nombre de feuilles ou fruits tavelés sur le nombre total

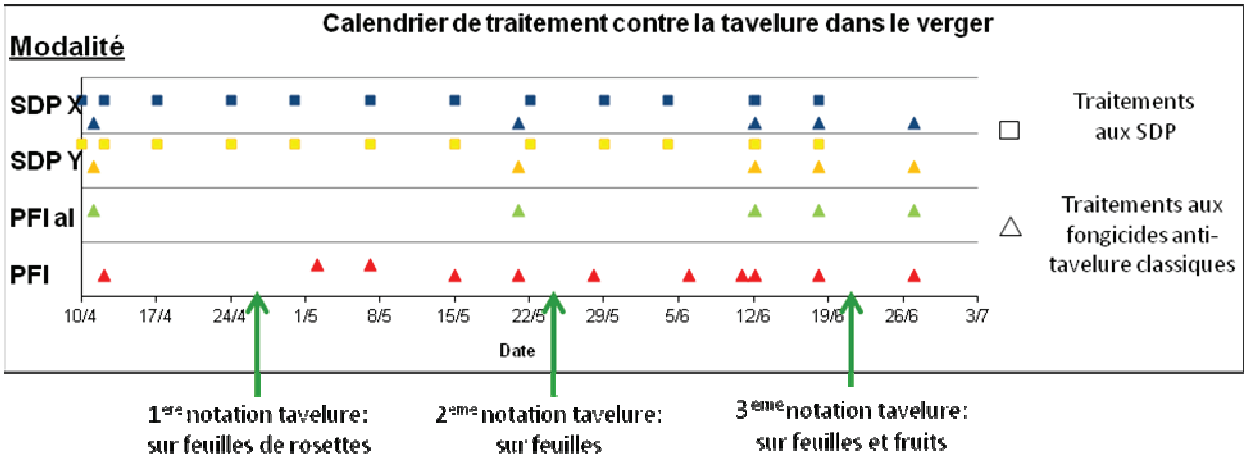


Figure 7: Calendrier de traitement contre la tavelure. Données issues des suivis de traitement au laboratoire.

de feuilles ou fruits observés. Les lectures sont réalisées à 3 dates de sortie de taches (Figure 7), prévues par le modèle Pulsowink. La première est réalisée sur feuilles de rosettes encadrant les bouquets floraux, la deuxième sur feuilles de pousses et la troisième sur feuilles de pousses et sur fruits.

c) *Outils d'analyse statistique*

Pour les données issues des lectures « tavelure » en verger, les variables réponses (incidence) sont continues. Le test de Kolmogorov-Smirnov vérifie que cette variable ne suit pas une loi normale. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis est alors appliqué pour répondre à l'hypothèse que les traitements ont le même effet sur l'incidence. Si $p<0.05$, l'hypothèse est rejetée, et le test non paramétrique de comparaison des intervalles de confiance de la médiane sur une représentation en boîte à moustaches de Tukey est appliqué.

Sur cette représentation, les boîtes correspondent au premier et au troisième quartile, la médiane et la moyenne étant respectivement représentées par un trait et un carré rouge. Les moustaches marquent les valeurs maximales et minimales observées.

Lorsque les intervalles de confiance ne se superposent pas, les deux traitements sont significativement différents à 95% (Chambers *et al.*, 1983). Les classes statistiques sont déterminées sur chaque représentation en boîtes à moustaches à l'aide d'un code lettres (a, b, c, d, e). Les boîtes à moustaches surmontées des mêmes lettres représentent des groupes de données non significativement différents. L'ensemble des tests et la représentation en boîtes à moustaches de Tukey ont été menés avec le logiciel STATGRAPHICS® Centurion XV (SIGMA PLUS, Levallois-Perret, France).

4. Résultats

L'étude présentée ici consiste dans un premier temps à caractériser la potentialisation des réactions de défense du pommier par un SDP au niveau épigénétique. Il s'agira d'analyser différentes portions des promoteurs de gènes de défense en vérifiant si elles constituent ou non de la chromatine libre de protéines en fonction des traitements SDP que les tissus foliaires auront reçu. La méthodologie FAIRE sera appliquée pour isoler la chromatine libre. Une PCR permettant d'amplifier les différentes portions de la région promotrice des gènes de défense sélectionnés (PR4, Alliinase et EDS1) et d'un gène de référence (GAPDH) sera réalisée sur la fraction de chromatine libre obtenue. Cette PCR sera appliquée sur des échantillons potentialisés et non potentialisés.

La première étape a consisté à mettre au point la méthodologie FAIRE qui permet d'obtenir la chromatine libre à partir de feuilles de pommier. J'ai ensuite sélectionné les amorces fonctionnelles parmi celles dessinées préalablement au laboratoire, puis j'ai déterminé leurs conditions optimales d'utilisation. Une analyse transcriptionnelle a été effectuée en amont afin d'identifier les conditions optimales de potentialisation du pommier (en serre, sur plantules/scions, ou en verger) pour réaliser les FAIRE-PCR sur les échantillons *ad-hoc*.

Dans un second temps, j'ai mesuré le pouvoir protecteur en verger du SDP utilisé tout au long de mon stage.

Chacune de ces étapes est développée successivement dans les parties suivantes.

4.1. Mise au point de la méthodologie FAIRE sur feuilles de pommier

La méthodologie FAIRE consiste à isoler la chromatine libre de protéines par une étape de fixation au formaldéhyde (fixation des liaisons protéines-ADN), suivie d'une sonication (production des fragments de chromatine de la taille adéquate), et finalisée par une extraction d'ADN au phénol-chloroforme (élimination des fragments de chromatine non libre avec la phase organique). Dans l'adaptation de la méthodologie au pommier, les paramètres à déterminer sont la concentration de formaldéhyde pour que la fixation soit efficace, et les conditions de sonication comprenant l'amplitude utilisée, le nombre de cycles de sonication, ainsi que la durée d'un cycle comprenant un temps de sonication (on) et un temps de pause (off). Les résultats concernant ces paramètres sont traités dans les sous-parties suivantes.

4.1.1. Concentration de formaldéhyde

Des feuilles détachées de semis de Golden sont infiltrées sous vide avec différentes concentrations de formaldéhyde, de 0 à 3%, pour déterminer la concentration optimale nécessaire à la fixation protéines-ADN. En effet, une concentration trop faible ne permettrait pas la mise en place des liaisons protéines-ADN nécessaires à la purification de chromatine libre,

Rapport-Gratuit.com

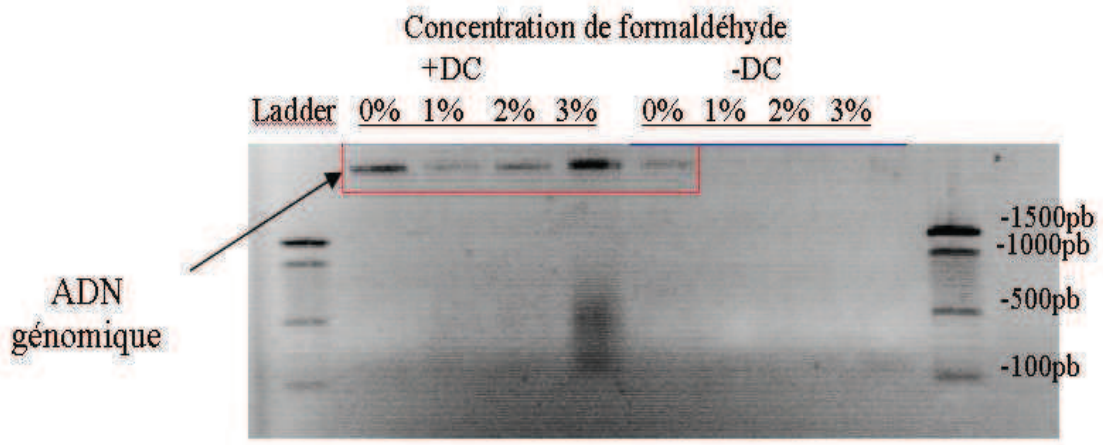


Figure 8: Observation sous UV des gels d'agarose des ADN des échantillons infiltrés avec du formaldéhyde aux différentes concentrations 0%, 1%, 2% et 3%.

Avant l'extraction d'ADN au phénol-chloroforme, un aliquot est mis à l'étuve à 60°C pour défaire les liens protéine-ADN (decrosslinking ou +DC), et un autre est extrait tel quel (-DC).

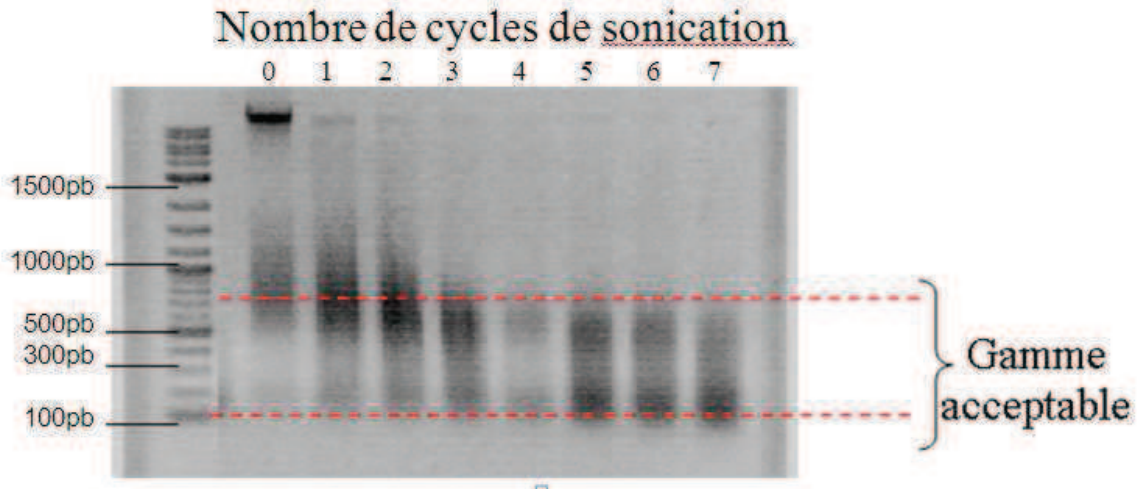


Figure 9: Détermination des conditions de sonication efficaces.

Observation sous UV des gels d'agarose des ADN d'un échantillon infiltré avec du formaldéhyde à 3%, et soniqué à une amplitude de 20%, de 0 à 7 cycles de 1mn, dont 7s de marche (on) et 0.5 d'arrêt (off). Avant l'extraction d'ADN au phénol-chloroforme, les échantillons sont mis une nuit à l'étuve à 60°C pour défaire les liens protéine-ADN (decrosslinking ou +DC).

tandis qu'un excès de fixation conduirait à la mise en place de liaisons ADN-ADN difficilement réversible, rendant l'étude de la chromatine libre impossible par biologie moléculaire. La réversibilité des interactions protéines-ADN ou ADN-ADN est estimée de la manière suivante: une extraction d'ADN, comprenant une phase de purification au phénol-chloroforme, est réalisée sur les noyaux lysés, ayant ou non subis un passage d'une nuit à 60°C permettant un défaire les liens protéines-ADN (« decrosslinking » ou +DC). Les différents extraits d'ADN obtenus en fin d'extraction sont comparés par migration sur gel d'agarose. Une fixation réussie permet de révéler de l'ADN génomique seulement après un decrosslinking.

Le résultat (Figure 8) montre que, en absence de formaldéhyde, de l'ADN génomique est obtenu dans les extraits, qu'ils aient subi ou non le passage à 60°C. Par contre, en présence de formaldéhyde, l'ADN génomique n'est récupéré que dans les échantillons ayant subi le decrosslinking, et ceci quelle que soit la concentration de formaldéhyde. La fixation est donc efficace et réversible avec une concentration de formaldéhyde de 1 à 3%. Pour les expériences ultérieures, la concentration de 3% de formaldéhyde est retenue pour éviter tout risque de non fixation.

4.1.2. Conditions de sonication

Dans la méthodologie FAIRE, une fois la fixation au formaldéhyde effectuée, une sonication est réalisée pour obtenir des fragments de taille comprise entre 150 à 750 paires de bases, et un optimum entre 300 et 500 paires de bases nécessaire aux études ultérieures sur la chromatine libre.

Afin de déterminer le nombre de cycles de sonication minimal nécessaire pour atteindre cette taille, un lysat de noyaux issu de feuilles infiltrées avec 3% de formaldéhyde est soniqué avec un nombre de cycles de une minute croissant, en appliquant une amplitude de 20%. Chaque cycle est composé d'un temps de marche de 7s (on) et d'un temps d'arrêt de 0,5s (off) pour éviter le réchauffement des échantillons et donc préserver la fixation nécessaire à l'extraction de la chromatine libre. Le surnageant récupéré après cette sonication est incubé à 60°C pendant la nuit pour défaire les liens ADN-protéines. L'ADN extrait est ensuite soumis à électrophorèse sur gel d'agarose puis révélé.

Le résultat (Figure 9) montre que de l'ADN génomique non fragmenté est récupéré en absence de sonication, et on obtient des fragments de plus en plus petits à mesure qu'on augmente le nombre de cycles. On arrive à la taille recherchée à partir de 5 cycles, qui sera le nombre minimum de cycles à appliquer dans les sonications ultérieures. L'efficacité de sonications des expériences ultérieures sera systématiquement vérifiée au bout de 5 cycles, et des cycles pourront être rajoutés si besoin jusqu'à ce que la taille recherchée soit atteinte.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

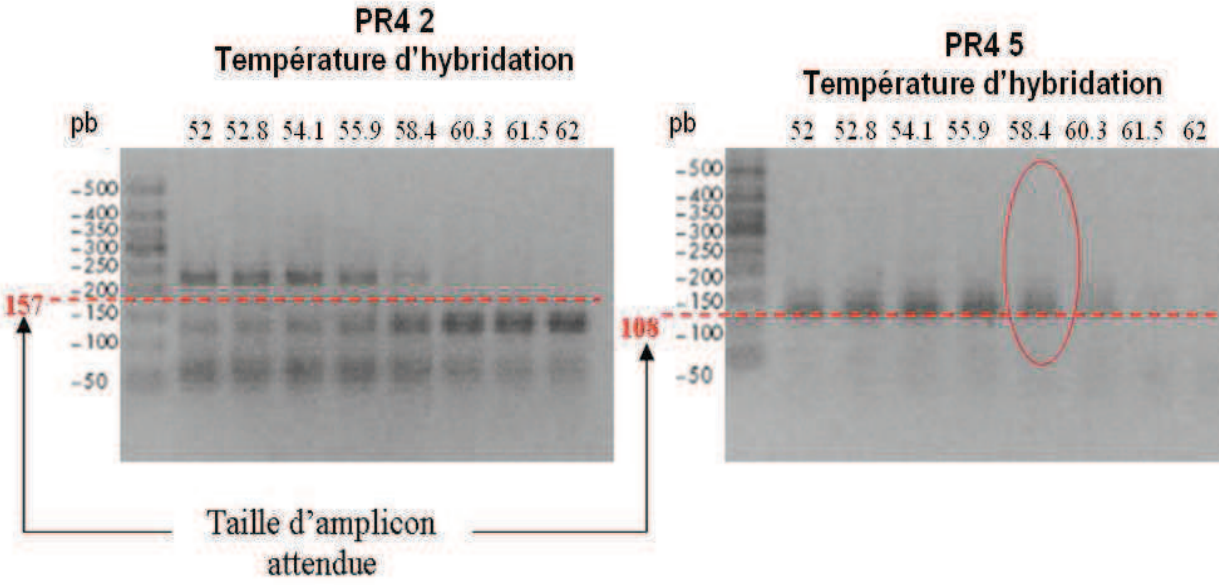


Figure 10: Détermination de la température d'hybridation des couples d'amorces de promoteurs de gènes de défense, exemple du couple d'amorces PR4 2 et PR4 5.

Pour chaque couple d'amorces, un gradient de PCR, avec une température d'hybridation allant de 52.0°C à 62.0°C, est réalisé sur de l'ADN génomique de la variété Golden delicious. Encerclé en rouge, l'amplicon obtenu avec la température d'hybridation commune à tous les couples d'amorces fonctionnels.

4.2. Mise au point des conditions d'utilisation des amorces pour l'analyse PCR des promoteurs de gènes de défense

Pour confirmer l'hypothèse de modifications épigénétiques au niveau du paysage nucléosomique des feuilles potentialisées, il faut disposer de couples d'amorces qui permettent d'analyser par PCR l'enrichissement des promoteurs de gènes de défense dans la fraction de chromatine libre. Des couples d'amorces ont été dessinés préalablement, pour amplifier la région promotrice de 2000 paires de bases précédant le codon start de trois gènes de défenses potentialisables par les SDP: PR4, Allii et EDS1; ainsi qu'un gène de référence au niveau d'expression constant : GAPDH. Selon les gènes, 7 à 10 couples d'amorces ont pu être dessinés. La température d'hybridation de ces amorces est déterminée sur de l'ADN génomique de la variété Golden Delicious par un gradient de température d'hybridation allant de 52°C à 62°C.

La révélation sous UV des gels d'électrophorèse de tous les échantillons est retrouvée en annexe III. La figure 10 ci-contre illustre les résultats. Pour le deuxième couple d'amorces du promoteur du gène de défense PR4 (PR4 2), la PCR a amplifié à deux tailles différentes pour les températures d'hybridation allant de 52°C à 58,4°C. Par ailleurs, même quand on obtient un seul amplicon, à partir d'une température d'hybridation de 60,3°C, celui-ci présente une taille différente de celle attendue. Le couple d'amorces PR4 2 n'est donc pas spécifique de la région ciblée et ne sera pas retenu pour réaliser l'analyse FAIRE-PCR. Par contre, pour le cinquième couple d'amorces du promoteur de PR4 (PR4 5), la PCR a amplifié à la taille attendue pour les températures d'hybridation allant de 52°C à 60,3°C. Ce couple d'amorces est donc fonctionnel et peut être utilisé dans les études ultérieures.

Les révélations sur gel ont permis de distinguer les amorces fonctionnelles (PR4 : 5 et 8, Allii 1, EDS1 : 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, GAPDH : 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 et 10) de ceux qui amplifient à une autre taille que prévue (PR4 : 1, 2, 3, 4, 6, 7, et 9 ; Allii : 2, 3, 5, 6 et 7) ou à deux tailles différentes (GAPDH : 4 et 6), ou n'amplifient pas (Allii : 4 et 8). Les 18 couples d'amorces retenus dont 2 pour PR4, 1 pour Alliinase, 7 pour EDS1 et 8 pour GAPDH, sont visualisés synthétiquement dans l'annexe IV. Le résultat général montre que la température d'hybridation optimale commune à tous les couples d'amorces fonctionnels est 58,4°C. Cette température est retenue comme température d'hybridation pour toute l'analyse FAIRE-PCR ultérieure.

4.3. Validation de la méthodologie FAIRE-PCR

Cette partie de l'étude a pour but de vérifier si la méthodologie FAIRE mise au point sur pommier est suffisamment efficace pour analyser par PCR la fraction de chromatine libre.

Des feuilles d'arbres Golden sont prélevées et infiltrées au formaldéhyde à 3%. L'échantillon subit la lyse du noyau, et est soniqué à une amplitude de 20% avec 10 cycles de 1mn (7s on, 0,5s

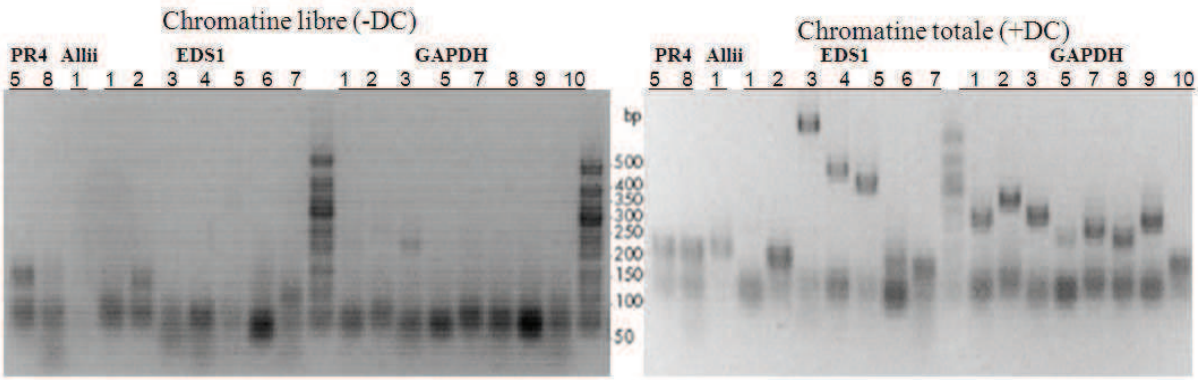
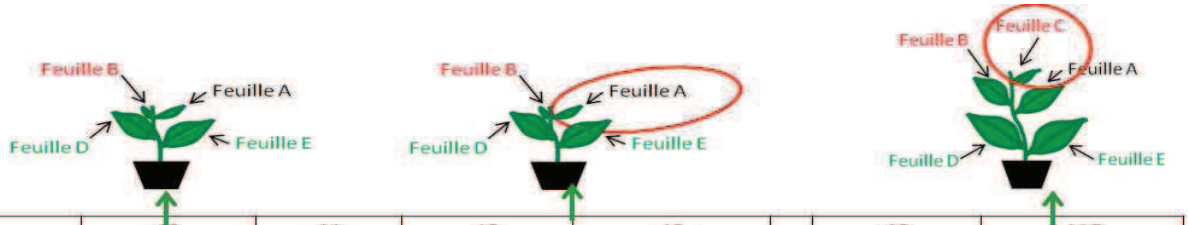


Figure 11: FAIRE-PCR sur des tissus avec et sans « decrosslinking ».

Des feuilles d'arbres Golden sont prélevées et infiltrées au formaldéhyde à 3%. Les noyaux purifiés sont lysés puis soniqués à une amplitude de 20% avec 10 cycles de 1mn (7s on, 0.5s off). Avant l'extraction d'ADN au phénol-chloroforme, un aliquot est mis à l'étuve à 60°C pour dénaturer les liaisons protéines-ADN (decrosslinking ou +DC) et représentera la chromatine totale. Un autre est extrait tel quel (-DC) et représentera la chromatine libre. Les ADN obtenus à partir de ces deux conditions sont dilués à 100ng/µl et analysées par PCR. La PCR est basée sur les couples d'amorces fonctionnels, sélectionnés préalablement, des promoteurs des trois gènes de défense (PR4, Alliinase et EDS1), ainsi que du gène de référence (GAPDH). La température d'hybridation utilisée est 58.4°C. Les amplifiats sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et révélés afin de comparer l'amplification des promoteurs des gènes d'intérêt dans la chromatine libre et dans la chromatine totale.



	J0	J1	J2	J3		J9	J10
Essai sur semis de Golden	Prélèvement Calibrateur Traitement SDP ou eau		Traitement H_2O_2	Prélèvement feuilles A			
						Traitement H_2O_2	Prélèvement feuilles C
Essai sur scions de Gala	Prélèvement Calibrateur Traitement SDP ou eau	Traitement H_2O_2	Prélèvement feuilles A				
Essai sur arbres en verger	Prélèvement Calibrateur Traitement SDP	Traitement H_2O_2	Prélèvement feuilles A				

Figure 12: Traitements et prélèvements

off). Avant l'extraction d'ADN au phénol-chloroforme, un aliquot est mis à l'étuve à 60°C pour défaire les liens protéine-ADN (decrosslinking ou +DC) et représentera la chromatine totale. Un autre est extrait tel quel (-DC) et représentera la chromatine libre. Les ADN obtenus à partir de ces deux conditions sont dilués à 100ng/µl et analysées par PCR. La PCR est réalisée avec les 18 couples d'amorces fonctionnels sélectionnés (voir 4.2) à la température d'hybridation de 58.4°C, puis les amplifiats sont soumis à électrophorèse et révélés afin de comparer l'amplification des promoteurs des gènes sélectionnés dans la fraction de chromatine libre et dans la chromatine totale.

Le résultat (Figure 11) montre que, pour l'échantillon gardé une nuit à 60°C avant l'extraction d'ADN, un amplicon est observé pour chaque puits. Toutes les portions des promoteurs des gènes concernés ont donc été amplifiées. Leurs tailles correspondent aux tailles d'amplification attendues. En revanche, pour l'échantillon extrait sans « decrosslinking », seules quelques portions selon le gène sont amplifiées. La méthodologie FAIRE-PCR mise au point permet donc réellement d'isoler la chromatine libre de la chromatine totale et de mettre en valeur les portions enrichies en chromatine libre de promoteurs de gènes.

4.4. Sélection des échantillons potentialisés

Une analyse transcriptionnelle est réalisée pour comparer les feuilles de pommier traitées au SDP X, celles traitées et stressées, et celles qui n'ont pas été traitées, afin de déterminer des échantillons potentialisés. Deux répétitions biologiques sur semis (Golden), un essai sur scions (Gala) et deux répétitions biologiques sur arbres (Golden) ont pu être réalisés. Des pommiers (semis, scions, arbres) ont été pulvérisés au SDP X ou à l'eau en témoin négatif. Les feuilles traitées ont été prélevées 2 ou 3 jours après traitement, après avoir subi ou non la veille une application d'H_2O_2 mimant l'attaque d'un bioagresseur. Les feuilles néoformées ont été prélevées sur semis uniquement, 10 jours après traitement (avec ou sans application d' H_2O_2 24h avant). La démarche de prélèvement est illustrée dans la figure 12. Les expressions relatives des trois gènes de défense sélectionnés, PR4, Alliinase et EDS1, calculées par rapport aux échantillons traités à l'eau ou en PFI allégée, y ont été analysées et sont représentées sous forme d'une *heatmap*.

La *heatmap* obtenue sur semis (Figure 13-A) montre que, pour le deuxième essai à J3, les expressions relatives des gènes croissent remarquablement avec les applications de stress et de SDP X, tel que Eau < Eau+H_2O_2 < SDP X < SDP X+H_2O_2. Le stress à l'H_2O_2 provoque donc bien à lui seul une induction de l'expression des gènes, mais celle-ci est plus forte dans les tissus traités préalablement au SDP X. Dans les feuilles néoformées (J10), la forte induction provoquée par le stress se retrouve pour PR4. Pour Alliinase et EDS1, le stress ou le SDP X seul n'induit pas l'expression des gènes. La surexpression de ces deux gènes dans les échantillons traités et

Sur semis de Golden (1)	Echantillons	J3 Eau	J3 Eau H202	J3 SDP X	J3 SDP X H202	J10 Eau	J10 Eau H202	J10 SDP X	J10 SDP X H202
	PR4	3,03	-3,28	ARN dégradé	8,44	2,23	4,97	2,71	4,03
	Alli	1,67	-0,79		6,64	1,87	2,12	0,06	2,00
	EDS1	-2,00	-1,45		1,05	-2,37	-0,70	-0,37	-1,48
Sur semis de Golden (2)	Echantillons	J3 Eau	J3 Eau H202	J3 SDP X	J3 SDP X H202	J10 Eau	J10 Eau H202	J10 SDP X	J10 SDP X H202
	PR4	1,07	3,49	4,49	10,47	0,61	5,09	0,57	5,98
	Alli	0,53	3,39	5,98	8,71	2,26	0,26	1,96	3,01
	EDS1	1,94	3,62	6,17	6,91	1,89	-0,51	1,30	3,30

(A)

Sur scions de Gala	Echantillons	J2 Eau	J2 Eau H202	J2 SDP X	J2 SDP X H202
	PR4	0,00	3,24	2,86	4,14
	Alli	0,00	4,39	4,46	5,71
	EDS1	0,00	1,97	-2,28	3,56

(B)

En verger (1)	Echantillons	J2 PFIal	J2 PFIal H2O2	J2 SDP X	J2 SDP X H2O2
	PR4	0,00	-0,48	1,58	1,63
	Alli	0,00	0,99	1,22	0,83
	EDS1	0,00	1,09	0,17	-1,19
En verger (2)	Echantillons	J2 PFIal	J2 PFIal H2O2	J2 SDP X	J2 SDP X H2O2
	PR4	0,00	0,26	1,25	2,61
	Alli	0,00	2,09	1,82	3,19
	EDS1	0,00	2,68	3,62	4,06

(C)

Figure 13: *Heatmap* des 3 gènes de défense (PR4, Alliinase et EDS1) obtenues par RT-qPCR (qPFD) et calculées par rapport aux témoins eau et PFI al à chaque temps.

Le SDP X est appliqué ou non à J0 et un traitement à l'H_2O_2 est réalisé ou non 24h avant le prélèvement afin de révéler d'éventuels effets potentialisateurs. Echelle de variation des log2 (expression relative) : ≤ -7 ⟷ ≥ +7. **A)** *Heatmap* de deux répétitions biologiques indépendantes effectuées sur semis de la variété Golden Delicious. **B)** *Heatmap* réalisé pour un essai sur des scions de la variété Gala. **C)** *Heatmap* de deux répétitions biologiques indépendantes effectuées sur arbres de la variété Golden. Delicious.

stressés correspond ainsi à une potentialisation. On note une différence entre les deux essais. L'effet du stress seul à J3 n'est pas confirmé dans le premier essai sur semis de Golden car les gènes y sont réprimés. A J10, le stress seul provoque une forte induction de PR4, supérieure à celle dans l'échantillon traité préalablement au SDP X. Par ailleurs, on ne retrouve pas la surexpression des gènes Alliinase et EDS1 à J10. Seule la première répétition sera donc analysée en FAIRE-PCR, d'autant plus que l'échantillon traité au SDP X de la première répétition a été dégradé au cours de l'extraction.

Concernant les scions (Figure 13-B), le SDP X provoque une induction de PR4 et d'Alliinase, mais cette induction est également initiée par le stress seul. Cependant, l'effet d'un traitement préalable au SDP X sur l'induction d'des trois gènes lors de l'application du stress secondaire est remarquable. Il y a donc une potentialisation de l'expression des gènes de défense étudiés et les échantillons de cet essai sont retenus pour l'analyse FAIRE-PCR ultérieure.

En verger (Figure 13-C), le SDP X provoque une induction de l'expression des trois gènes et particulièrement une surexpression d'EDS1. Le stress seul favorise aussi une induction de l'expression d'Alliinase et EDS1. On note toutefois une plus forte surexpression des trois gènes face au stress quand les feuilles sont préalablement traitées au SDP X. La potentialisation est ainsi validée pour cet essai. Quant au premier essai, il ne révèle aucune surexpression des gènes, et les inductions d'expression de gène ne diffèrent pas beaucoup selon le traitement. La potentialisation n'étant pas confirmée, seuls les échantillons du deuxième essai en verger sont retenus pour l'analyse FAIRE-PCR ultérieure.

4.5. FAIRE-PCR sur échantillons potentialisés

Suite aux validations de la potentialisation, l'analyse FAIRE-PCR est appliquée pour étudier le paysage nucléosomique au niveau des régions promotrices des gènes de défense dans les échantillons potentialisés et non potentialisés. Ceci est fait pour vérifier si la potentialisation dans les feuilles de pommier implique réellement une modification épigénétique au niveau des promoteurs de gènes de défense. La chromatine libre est extraite à partir de ces échantillons, toujours avec les conditions mises au point dans les premiers résultats. Une PCR est réalisée sur les régions promotrices de PR4, Allii, EDS1 et GAPDH avec les couples d'amorces sélectionnés. Les amplifiats sont soumis à électrophorèse et révélés afin de comparer l'amplification des promoteurs des gènes de défense pour la fraction de chromatine libre dans les échantillons potentialisés et non potentialisés. La comparaison entre échantillons n'a été possible que pour des échantillons dont les portions du promoteur du gène de référence GAPDH sont amplifiées avec un niveau équivalent.

La suite du rapport montre les différences d'amplification des gènes de défense, pour une même amplification du gène de référence dans des échantillons potentialisés ou non.

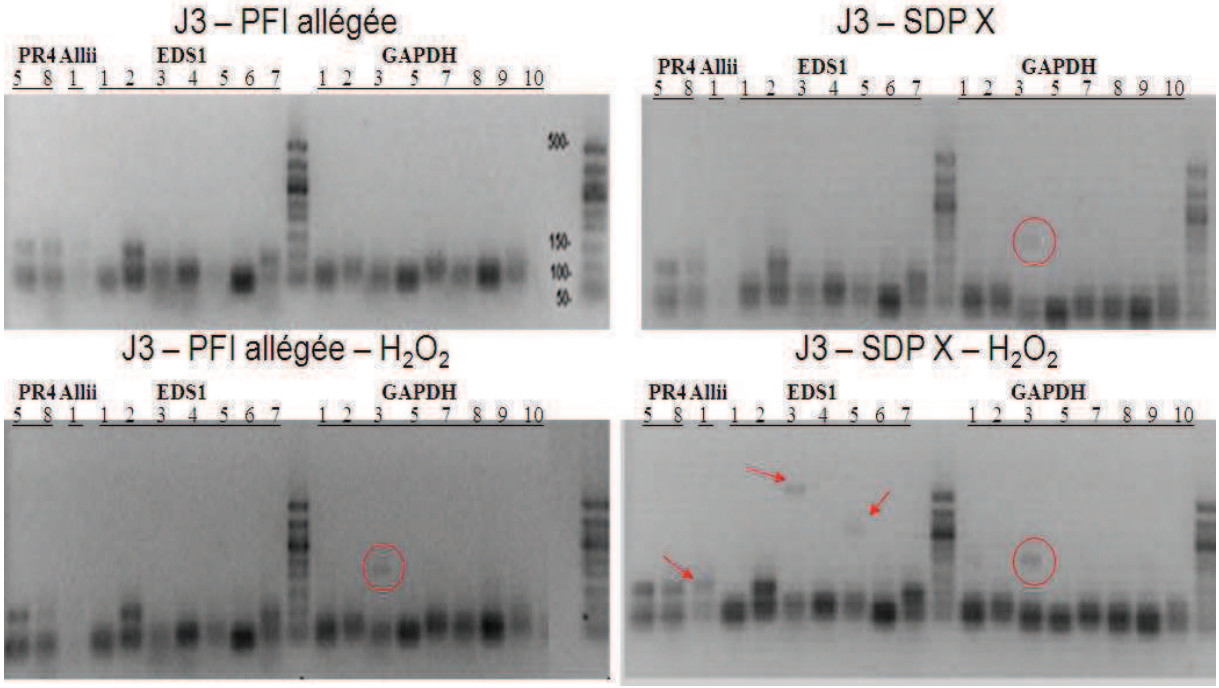


Figure 14: Analyse FAIRE-PCR des échantillons du deuxième essai en verger.

Le SDP X est appliqué ou non à J0 et un traitement à l'H_2O_2 est réalisé ou non 24h après afin de révéler d'éventuels effets potentialisateurs. Les jeunes feuilles développées traitées sont prélevées à J2. Les fractions libres de la chromatine obtenues à partir de ces feuilles par la méthodologie FAIRE sont analysées par PCR. La PCR est basée sur les couples d'amorces fonctionnels, sélectionnés préalablement, des promoteurs des trois gènes de défense (PR4, Alliinase et EDS1), ainsi que du gène de référence (GAPDH). Les amplifiats sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et révélés afin comparer l'amplification des promoteurs des gènes de défense dans les échantillons potentialisés et non potentialisés.

Pour le deuxième essai en verger, les gels d'électrophorèse (Figure 14) sont présentés ci-contre. Dans l'échantillon potentialisé, c'est-à-dire stressé un jour après le traitement au SDP X, le couple d'amorces du promoteur du gène de référence (GAPDH 3) a produit un amplicon de la taille attendue. Cet amplicon est retrouvé sur les gels des échantillons seulement stressés ou seulement traités, à une intensité similaire. Les amplicons liés aux promoteurs de gènes de défense peuvent alors être comparés. Dans l'échantillon traité et stressé, deux couples d'amorces du promoteur d'EDS1 et le couple d'amorces du promoteur d'Alliinase ont permis d'obtenir un amplicon chacun. Ces amplifications ne sont cependant pas visibles dans l'échantillon seulement traité, ni dans celui seulement stressé. Le résultat suggère donc que le traitement suivi de stress a provoqué des modifications épigénétiques sur deux portions du promoteur d'EDS1 et une portion du promoteur d'Alliinase. Ces modifications ont produit des portions de chromatine libre qui ont pu être extraites par FAIRE. A cette étape, on ne peut cependant pas confirmer que ces modifications sont initiées dès le traitement au SDP X, pour préparer la feuille à une future attaque.

Pour les essais sur semis et sur scions, les gels (Annexe V) n'ont pas révélé une amplification de GAPDH semblable entre les différents échantillons, pour qu'on puisse comparer les amplifications des promoteurs de gènes de défense.

4.6. Effets de protection en verger

Le SDP X ayant prouvé son effet sur la potentialisation de l'expression des gènes de défense, il est intéressant de connaître l'effet de protection qu'il apporte. Son pouvoir de protection, ainsi que celui d'un autre SDP candidat (SDP Y), ont été testés contre la tavelure, en comparaison avec un témoin positif (PFI) et un témoin négatif (PFI al). Les effets des différents traitements sur l'incidence de la maladie ont été déterminés à trois dates de prévision d'apparition de taches. Les incidences de la tavelure sont déterminées dans chaque parcelle et les données sont représentées en boîte à moustaches de Tukey pour observer les différences significatives.

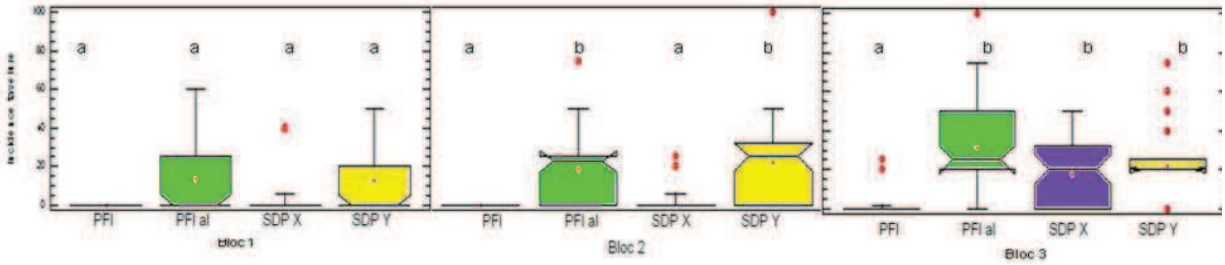
La première lecture effectuée sur feuilles de rosettes correspond à une faible pression de tavelure et n'a pas distingué d'effet des traitements sur l'incidence de la maladie. La figure correspondante est présentée en annexe VI.

La deuxième lecture est réalisée sur feuilles au 8ème passage de traitement en SDP. La troisième est effectuée sur feuilles et sur fruits et correspond au 12ème passage de traitement de SDP dans l'année. L'effet bloc a été vérifié pour ces deux dernières lectures. La pression tavelure s'est avérée moins forte dans le bloc 1 que dans les deux autres (Annexe VII). Les résultats sont de ce fait représentés par bloc (Figure 15).

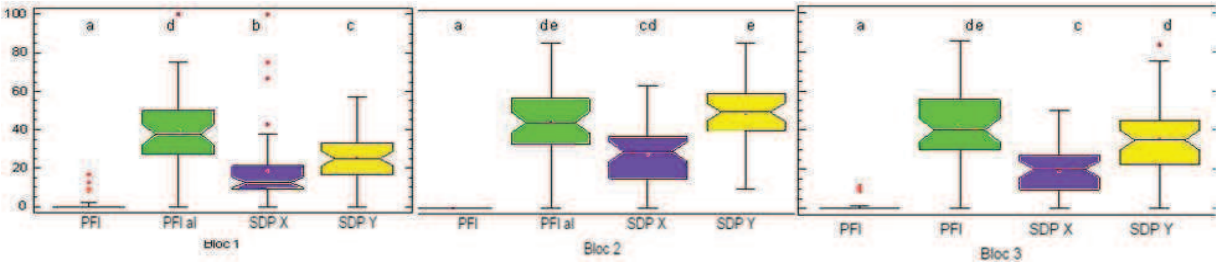
Au huitième traitement en SDP, l'incidence de la tavelure dans la modalité PFI est nulle dans les trois blocs. Le bloc 1 montre une faible pression tavelure face à laquelle toutes les modalités

Rapport-Gratuit.com

A) Pouvoir de protection contre la tavelure en verger
Deuxième lecture sur feuilles, au 8ème passage de SDP



B) Pouvoir de protection contre la tavelure en verger
Troisième lecture sur feuilles, au 12ème passage de SDP



C) Pouvoir de protection contre la tavelure en verger
Troisième lecture sur fruits, au 12ème passage de SDP

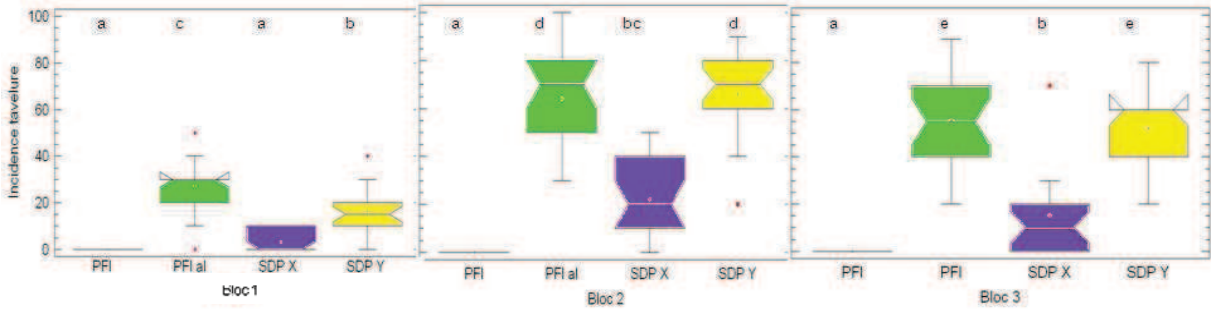


Figure 15: Boîtes à moustaches avec encoches représentant l'effet des quatre modalités de traitement sur l'incidence en tavelure.

Lecture sur feuilles au 8ème passage de traitement en SDP (A) et sur feuilles (B) et sur fruits (C) au 12ème passage de traitement en SDP. Données issues des notations en verger. Les lettres indiquent les classes statistiques.

ont le même effet. Le SDP X prouve son efficacité sur la réduction de l'incidence de la maladie dans le bloc 2 (incidence nulle contre une incidence de 60% dans les parcelles PFI al et SDP Y). Seulement dans le troisième bloc où il y a plus de pression tavelure, le SDP X a le même effet que le SDP Y et la PFI al. Quant au SDP Y, il a le même effet que la PFI al dans tous les blocs.

La troisième lecture sur feuilles et sur fruits montre aussi une efficacité totale de la PFI dans les trois blocs. Après la modalité PFI, la modalité SDP X est le plus efficace avec une incidence de la maladie significativement plus faible que dans les parcelles SDP Y et PFI al. SDP Y protège généralement de la même manière que le traitement allégé, sauf sur feuilles dans le bloc 1 où il est un peu plus efficace. Les boîtes à moustaches ont généralement la même allure sur feuilles et sur fruits, ce qui signifierait que la protection sur feuilles se reproduit sur la protection des fruits.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

5. Discussion

5.1. Corrélation entre modifications épigénétiques et potentialisation

L'objectif de l'étude est d'identifier les enrichissements en chromatine libre dans les promoteurs des gènes de défense des feuilles de pommier potentialisées.

Le *heatmap* pour le deuxième essai en verger a montré que l'expression des trois gènes de défense sont induits par le SDP X, mais ont besoin de l'application du stress pour renforcer leur expression. La potentialisation des arbres de Golden en verger par le SDP X est ainsi confirmée. EDS1, qui est un gène impliqué dans la voie de signalisation de l'acide salicylique, est le plus induit. Sa forte expression dans l'échantillon traité et stressé correspond à un enrichissement en chromatine libre dans deux régions de son promoteur. L'hypothèse de départ est que cet enrichissement est mis en place dès le traitement au SDP pour préparer la plante aux agressions futures (Conrath, 2011). L'essai n'a pas confirmé cette hypothèse, car les portions concernées n'ont pas été amplifiées dans l'échantillon traité uniquement au SDP. Il est à noter que le prélèvement s'est fait deux jours après la pulvérisation du SDP. Certes, le gène est potentialisé, mais la différence d'expression dans l'échantillon seulement traité n'est pas flagrante. En effet, après le traitement, EDS1 est exprimé à 12.29 fois plus que dans le témoin non traité, contre 16.67 fois plus avec le stress (Figure 14). On peut supposer que la potentialisation provoquée par le SDP X est assez faible en verger, et qu'à J3, la chromatine libre n'est pas encore abondamment enrichie au niveau des promoteurs de gènes de défense. De ce fait, elle n'a pas pu être décelée immédiatement.

5.2. Critique de la démarche suivie

Des expérimentations menées sur *Arabidopsis thaliana* ont étudié l'existence de modifications épigénétiques dans les promoteurs de gènes de défense potentialisés. Ces études ont utilisé la méthode d'immunoprécipitation de la chromatine pour détecter l'enrichissement des histones méthylés et acétylées dans les promoteurs de plusieurs gènes WRKY (Jaskiewicz, 2011). Les résultats ont révélé une corrélation entre la potentialisation de WRKY par l'acibenzolar-S-methyl et l'enrichissement ou appauvrissement en histones méthylés et acétylés. Notre étude tente également de déterminer la présence de modifications épigénétiques sur les feuilles de pommier par une autre approche, le FAIRE-PCR. Au lieu d'analyser les promoteurs de gènes par le biais de modifications des histones, la méthodologie permet leur analyse au niveau des zones libres d'histones. La méthodologie choisie est donc plus précise, car elle ne met en évidence que les modifications des histones qui libèrent la

chromatine. Par ailleurs, au lieu de rechercher les modifications épigénétiques sur le gène codant pour des co-activateurs de transcription, la méthode s'intéresse aux gènes expliquant la potentialisation dans les feuilles de pommier. Elle élargit l'étude sur les 2000 paires de bases du promoteur du gène et permet d'identifier si la chromatine s'ouvre plus dans certaines portions que dans d'autres. La démarche choisie a permis de sélectionner des échantillons potentialisés, d'en obtenir des fractions de chromatine libre dans les promoteurs de gènes, et de les amplifier en PCR adaptée. L'étude n'a cependant pas pu aboutir à des résultats répétables pour tous les essais, notamment pour les limites suivantes.

5.2.1. Gènes de référence

Elle est freinée par une différence d'amplification du gène de référence GAPDH entre les échantillons. D'autres gènes de référence comme l'actine et la tubuline doivent être intégrés dans l'étude pour confirmer si ceux-ci n'ont pas également des portions modifiées par les SDP.

5.2.2. Purification d'ADN

Les résultats ont montré des différences d'amplification entre les échantillons. Ceci peut être dû aux quantités d'ADN qui n'ont pas toujours atteint 100ng/µl. Une faible quantité de cellules utilisée dès l'infiltration de formaldéhyde ou trop de fixation du formaldéhyde peuvent être en cause (Simon et *al.,* 2013). Il a déjà été vérifié dans les résultats que l'infiltration du formaldéhyde à 3% est efficace pour une fixation protéines-ADN réversible. La solution proposée est alors d'augmenter la quantité de cellules utilisée au départ en prélevant plus de feuilles. La pureté de l'ADN peut aussi erroner la quantité initiale à amplifier. Le protocole de Simon *et al* propose une étape de purification des échantillons sur des colonnes Zymo-spin suivi d'un dosage pour vérifier cette pureté.

5.2.3. Limites de la PCR

Une des limites de l'étude est la PCR sur la chromatine libre en elle-même. Elle n'est pas quantitative et suppose que les fragments que l'on cherche à amplifier avec les amorces choisies soient présents en entier dans cette fraction de chromatine libre. La perspective est de dessiner des amorces permettant d'amplifier des fragments plus courts, et les passer en qPCR.

Cette démarche reste cependant une approche ciblée, et on risque de passer à coté des informations en sélectionnant les gènes de défense à étudier. Maintenant que l'extraction de fragments de chromatine libre sur feuilles de pommier est bien fonctionnelle, on peut réitérer les essais et les compléter par une analyse plus globale par séquençage (FAIRE-Seq) afin d'avoir un paysage nucléosomique complet du pommier. Deux régions du promoteur du gène

de défense EDS1 sont plus amplifiées dans l'échantillon traité et stressé. Une analyse bioinformatique permettrait également de déterminer si ces portions de séquences contiennent des motifs nucléotidiques caractéristiques de zones de régulation génique.

5.3. Relation entre induction de gènes de défense et efficacité de protection

Le SDP X s'est avéré significativement efficace contre l'infestation naturelle de *Venturia inaequalis* en verger. Il a permis de réduire l'utilisation de fongicides anti-tavelure classiques à 5 passages de traitement contre 11 en protection fruitière intégrée. Dans le bloc 1, l'incidence tavelure sur fruits est similaire pour les parcelles traitées au SDP X et en PFI. Le SDP X montre ainsi un intérêt technique et environnemental dans la protection des pommiers. Des stimulateurs de défense ont déjà démontré cette efficacité dans d'autres cultures, mais doivent être utilisés en complément de produits phytosanitaires classiques, à cause de son efficacité limitée (Beckers & Conrath, 2007). Il en est de même pour l'usage du SDP X sur le pommier, car bien qu'ayant un effet significativement différent d'une protection fruitière allégée et du SDP Y, le SDP X ne permet pas d'obtenir une protection totale dans les blocs où la pression tavelure est plus forte.

Ces observations tavelure sont menées aux mêmes dates que les prélèvements pour l'analyse transcriptionnelle dans le bloc 1. La *heatmap* correspondante révèle des inductions des gènes de défense provoquées par le traitement en SDP X, ainsi qu'une potentialisation pour le deuxième essai. La relation entre l'induction des gènes et la protection sur champs est ainsi suggérée.

6. Conclusion

La potentialisation permet à une plante de répondre par des défenses plus fortes et plus rapides face à une attaque. L'objectif principal de l'étude est de vérifier l'hypothèse que la potentialisation des pommiers implique l'enrichissement en chromatine libre au niveau des promoteurs de gènes de défense. A cet effet, de la chromatine libre issue d'échantillons potentialisés a été analysée par une PCR permettant d'amplifier les régions promotrices de gènes de défense. En premier lieu, l'étude a mis au point la méthodologie FAIRE, qui permet d'obtenir la chromatine libre à partir de feuilles de pommier. Ensuite, elle a sélectionné les couples d'amorces nécessaires pour amplifier les promoteurs des gènes de défense PR4, Alliinase et EDS1, ainsi que celui du gène de référence GAPDH. Les échantillons potentialisés analysés en PCR ont été identifiés grâce à une analyse transcriptionnelle. Ainsi, la PCR a été effectuée pour les essais où la potentialisation était avérée, à savoir un essai sur semis, un essai sur scions et un essai sur arbres de Golden. Seuls les résultats du premier essai sur arbres sont interprétables, cependant, ils ne confirment pas l'hypothèse de départ. En effet, ils montrent que deux portions de promoteurs d'EDS1 sont enrichies en chromatine libre quand les feuilles traitées au SDP X réagissent à un stress. Mais l'ouverture de la chromatine dans ces régions n'est pas provoquée dès le traitement même, pour renforcer les défenses lors d'une attaque effective. Des répétitions de l'essai doivent être entreprises pour vérifier ce résultat. Pour optimiser la démarche, l'extraction de la chromatine doit se baser sur une plus grande quantité de feuilles et une étape supplémentaire de purification d'ADN. Un séquençage de la chromatine obtenue fournirait des informations plus complète sur le paysage nucléosomique du pommier.

L'étude s'est également intéressée à l'effet de protection du SDP X en verger, pour valoriser l'intérêt pratique de la potentialisation démontrée précédemment. Le SDP X s'est montré efficace pour réduire l'utilisation des fongicides anti-tavelure classiques en conservant un faible niveau d'infection des fruits par *Venturia inaequalis*. La potentialisation a en plus l'avantage de présenter un coût de fitness réduit, ce qui permet une prévention des maladies sans trop d'impact sur la production. Pour ces atouts, la potentialisation devient un phénomène important de plus en plus recherché en protection agricole. La compréhension des mécanismes qui la régit permettrait d'optimiser les formulations et les conditions d'utilisation des SDP qui la provoquent. Au final, les découvertes liées à la potentialisation et aux SDP sont un enjeu important dans la production agricole.

Rapport-Gratuit.com

Bibliographie

- Beckers G.J., and Conrath U. (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology,* 10: 425–431.
- Benhamou N., and Rey P. (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. II. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection,* 92: 24.
- Bertini L., Caporale C., Testa M., Proietti S., and Caruso, C. (2009). Structural basis of the antifungal activity of wheat PR4 proteins. *FEBS Letters,* 583: 2865-2871.
- Bleecker A.B., and Kende H. (2000). ETHYLENE : A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology,* 16: 1-18.
- Brisset M.-N., Devaux M., Heintz C., Chartier R., and Staub J. (2011a). Projet MPIA: Développement d'un outil moléculaire destiné à quantifier l'état d'induction de défenses d'un tissu de plante (Angers: Equipe GEFIN - UMR PaVé INRA/ACO/UA).
- Brisset M.N., Massot M., Porcher L., Devaux M., Heintz C., Braud F., Maillard A., Robert P., Marolleau B., and Chartier R. (2011b). Rapport DEFISTIM-Pommier (Angers: INRA).
- Bruce T.J.A., Matthes M.C., Napier J.A., and Pickett J.A. (2007). Stressful "memories" of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science,* 173: 603-608.
- Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes (France) (2002). Le pommier (Paris: Centretechnique interprofessionnel des fruits et légumes).
- Chambers J.M. (1983). Graphical methods for data analysis. (Wadsworth International Group ; Duxbury Press).
- Christensen A.B., Cho B.H., Naesby M., Gregersen P.L., Brandt J., Madriz-Ordenana K., Collinge D.B., and Thordal-Christensen H. (2002). The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology,* 3: 135-144.
- Conrath U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science,* 16: 524-531.
- Devoto A., and Turner J.G. (2005). Jasmonate-regulated Arabidopsis stress signalling network. *Physiologia Plantarum,* 123: 161-172.
- Dugé de Bernonville T. (2009). Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre Erwinia amylovora, agent du feu bacterien, et le pommier (Malus x domestica). Université d'Angers.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

- Giresi P.G., Kim J., McDaniell R.M., Iyer V.R., and Lieb J.D. (2007). FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res,.* 17: 877-885.
- Globowski A. (2008). Le point sur la situation pour l'autorisation et l'utilisation en France (Direction de la Qualité et de la Protection des végétaux, Direction générale Agriculture, Ministère de l'Agriculture -Paris).
- Haring M., Offermann S., Danker T., Horst I., Peterhansel C., and Stam M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods,* 3: 11.
- Indiana A. (2009). Etude du rôle éliciteur du Prohexadione-Calcium (Regalis) sur Pommier: efficacité en verger et inductions de défenses. Rapport de stage. Université d'Angers; IUT Angers-Cholet;Agrocampus-Ouest.
- Jaskiewicz M., Conrath U., and Peterhänsel C. (2010). Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Reports,* 12: 50-55.
- Livak K.J., and Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods,* 25: 402-408.
- Ma N., Tan H., Liu X., Xue J., Li Y., and Gao J. (2006). Transcriptional regulation of ethylene receptor and CTR genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (Rosa hybrida) cv. Samantha. *J.Exp. Bot.,* 57: 2763-2773.
- Marolleau B. (2011). Efficacité de protection de quatre stimulateurs de défenses nturelles sur pommier Malus x domestica. Rapport de stage de master 2. Université d'Angers;Agrocampus-Ouest.
- Marolleau B., Staub J., Barrière Q., Indiana A., Gravouil C., Chartier R., Heintz C., Devaux M., Tharaud M., Paulin J. (2013). La qPFD, un outil de criblage des SDP alias stimulateurs de défense des plantes. *Phytoma,* 42-45.
- Nagy P.L., and Price D.H. (2009). Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine,* 1: 400-406.
- Pajot E. (2009). Stimulation des Défenses Naturelles des plantes : Un engouement certain malgré un manque de connaissances préjudiciable! *Alter Agri,* 23-26.
- Ridgway P., Maison C., and Almouzni G. (2011). Functional organization of the genome: chromatin. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.
- Shah J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.,* 6:365-371.
- Simon J.M., Giresi P.G., Davis I.J., and Lieb J.D. (2013). A Detailed Protocol for Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE). In Current Protocols in

Molecular Biology, F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc..

- Thaler J.S., Humphrey P.T., and Whiteman N.K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science,* 17: 260-270.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., and Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7): 0034.1-0034.11.
- Venisse J.-S., Malnoy M., Faize M., Paulin J.-P., and Brisset M.-N. (2002). Modulation of defense responses of Malus spp. during compatible and incompatible interactions with Erwinia amylovora. *Mol. Plant Microbe Interact.,* 15: 1204-1212.
- Wiermer M., Feys B.J., and Parker J.E. (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr. Opin. Plant Biol*., 8: 383-389.

ANNEXES

Annexe I: Liste des gènes étudiés en qPFD

N°	Nom du gène	Fonction du gène/classe de gènes de défense
1	**PR-1**	Pathogenesis-related protein 1
		PR-protéine
2	**PR-2**	Pathogenesis-related protein 2 (glucanases)
		PR-protéine
3	**PR-4**	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like)
		PR-protéine
4	**PR-5**	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin/osmotin-like) PR-protéine
5	**PR-8**	Pathogenesis-related protein 8 (class III chitinase)
		PR-protéine
6	**PR-14**	Pathogenesis-related protein 14 (lipid transfer protein)
		PR-protéine
7	**PR-15**	Pathogenesis-related protein 15 (oxalate oxidase)
		PR-protéine
8	**PAL**	Phenylalanine ammonia-lyase
		Voie des phénylpropanoïdes
9	**CHS**	Chalcone synthase
		Voie des phénylpropanoïdes
10	**DFR**	Dihydroflavonol reductase
		Voie des phénylpropanoïdes
11	**ANS**	Anthocyanidin synthase
		Voie des phénylpropanoïdes
12	**PPO**	Polyphenol oxidase
		Voie des phénylpropanoïdes
13	**HMGR**	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase
		Voie des isoprénoïdes
14	**FPPS**	Farnesyl pyrophosphate synthase
		Voie des isoprénoïdes
15	**Far**	(E,E)-alpha-farnesene synthase
		Voie des isoprénoïdes
16	**Alli**	Alliinase
		Voie des cystéine sulfoxides
17	**APOX**	Ascorbate peroxidase Système antioxydant
18	**GST**	Glutathion S-transférase
		Système antioxydant
19	**POX**	Peroxidase
		Système antioxydant
20	**CalS**	Callose synthase
		Modification pariétale
21	**Pect**	Pectin methyl esterase
		Modification pariétale
22	**CAD**	Cinnamyl alcool dehydrogenase
		Modification pariétale

Rapport-Gratuit.com

23	**EDS1**	Disease resistance protein EDS1
		Signalisation acide salicylique
24	**WRKY**	WRKY transcription factor 30
		Signalisation acide salicylique
25	**LOX2**	Lipoxygenase AtLOX2
		Signalisatioin acide jasmonique
26	**JAR**	Jasmonate resistant 1
		Signalisatioin acide jasmonique
27	**ACCO**	1-aminocyclopropene-1-carboxylate oxidase
		Signalisation éthylène
28	**EIN3**	Ein3-Binding F Box Protein 1
		Signalisation éthylène
29	**TuA**	Tubulin alpha-1 chain
		Gène de référence
30	**Actin**	Actin 7
		Gène de référence
31	**GAPDH**	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
		Gène de référence

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

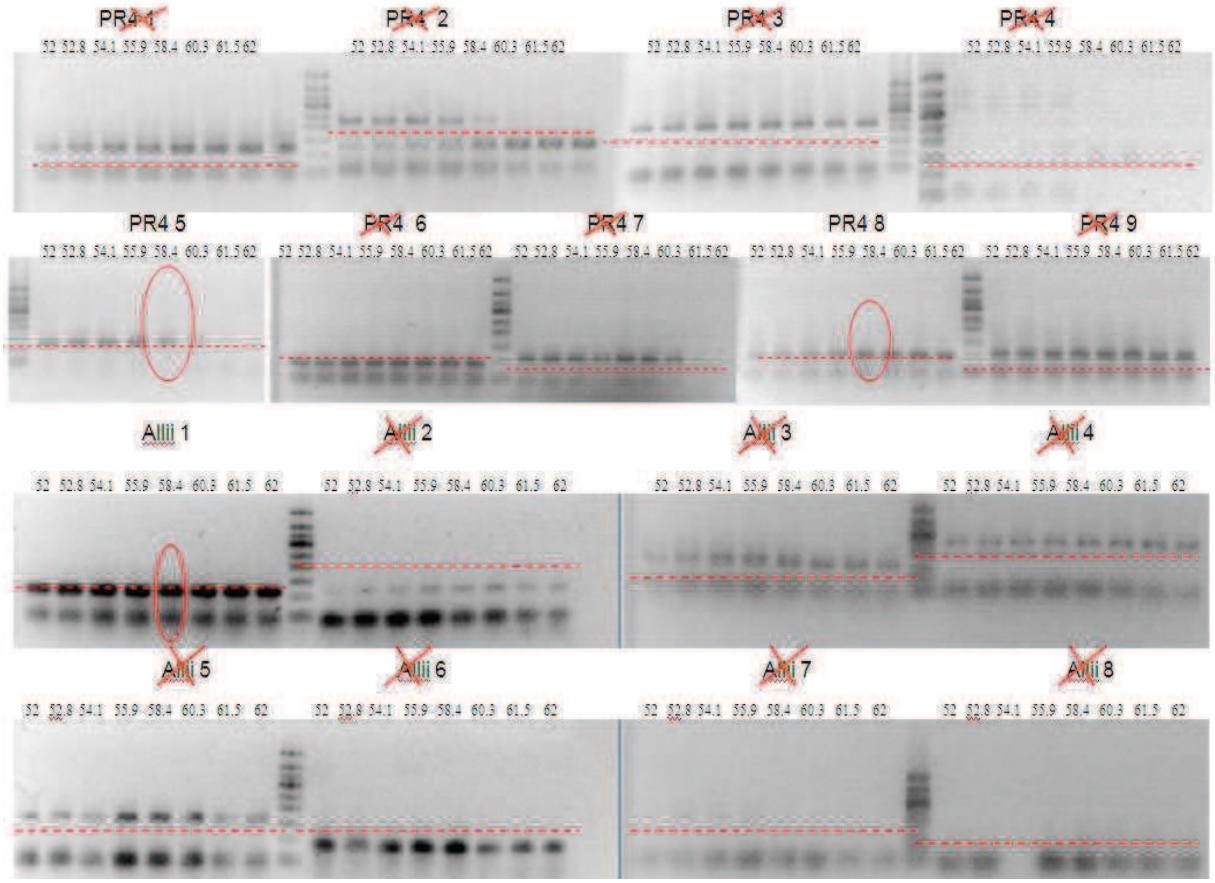
Annexe II: Séquence des amorces de promoteurs des gènes de défense PR4, Alli et EDS1, et du gène de référence GAPDH

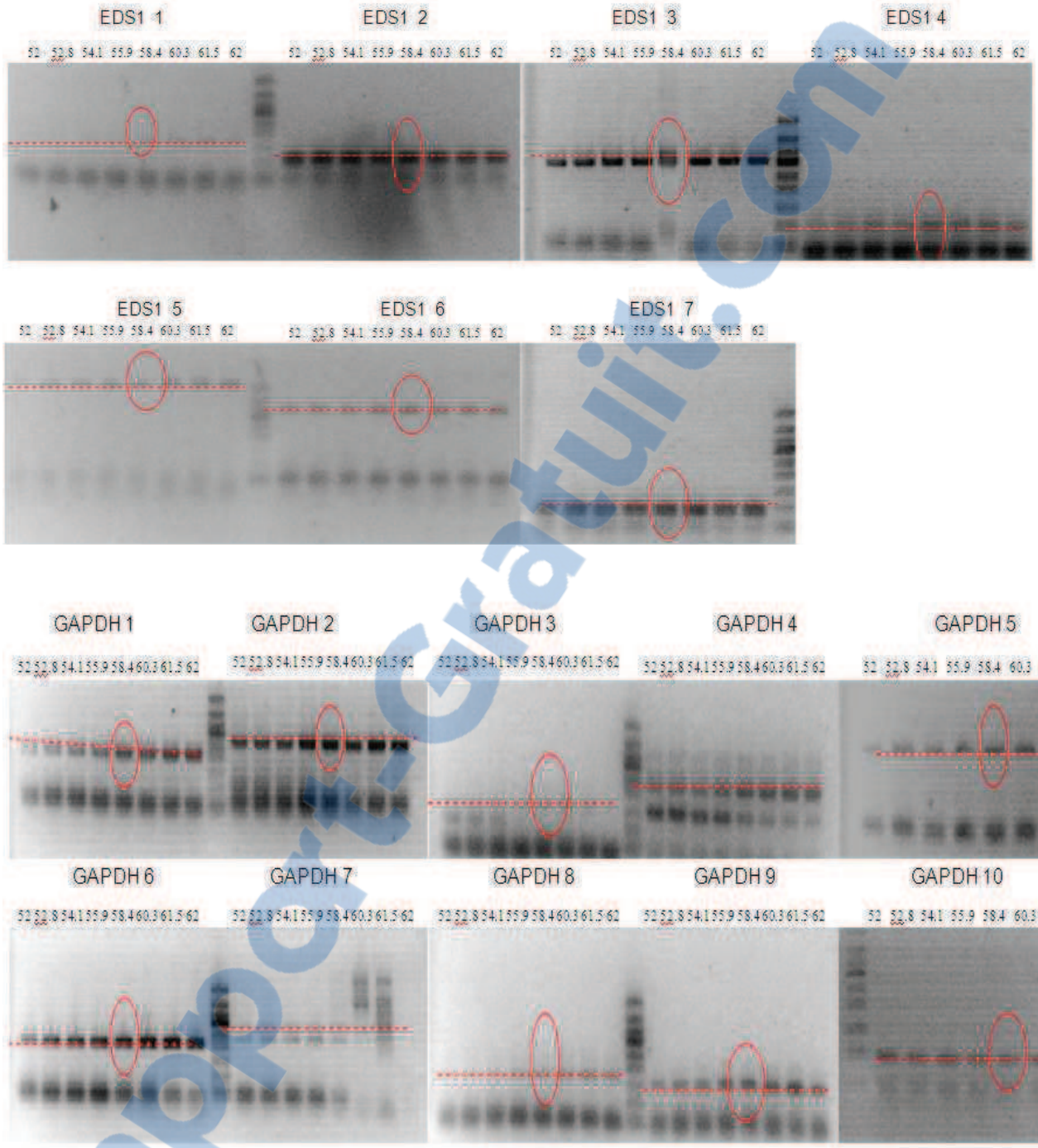
Nom de l'amorce	Séquence	Début	Taille de l'amplifiat (pb)
PR4			
PromPR4_1_F	gttttgggccttatcaaattca	117	74
PromPR4_1_R	catgttcaactttccggagata	191	
PromPR4_2_F	cttatggtgcggcaataggtt	204	157
PromPR4_2_R	gaggaaatttcattgcaccac	361	
PromPR4_3_F	atgaaatttcctcgaaaatgga	349	112
PromPR4_3_R	ttttggcctcctatgattatcc	461	
PromPR4_4_F	tccccccttagtagataatatcgttt	672	148
PromPR4_4_R	tttgatttagacgccttgttttt	820	
PromPR4_5_F	tccaagtaccggatagctccta	1026	108
PromPR4_5_R	cacgccacctaaaatgaagtct	1134	
PromPR4_6_F	cttctcttggctcggttttct	1138	103
PromPR4_6_R	aaaatacaagcgtgaggagacg	1241	
PromPR4_7_F	aatgttgacacctcgctctctc	1377	96
PromPR4_7_R	tttacttccttctggtcgcatc	1473	
PromPR4_8_F	aattgttccggtaattggacttt	1716	107
PromPR4_8_R	ggcgtatgtaaattgcctacca	1823	
PromPR4_9_F	tcagtaattgcaacaccaaacc	1856	89
PromPR4_9_R	ttcttggaaggctttggtacac	1945	
Allii			
PromAlli_1_F	ttttccgacactttatcctaaaaa	159	118
PromAlli_1_R	tgttcagggataattccatcgt	277	
PromAlli_2_F	ctcgtccgttctcctctatcac	302	220
PromAlli_2_R	tggtggtaaaatacatccctga	522	
PromAlli_3_F	tcccaatatctttaagtgttactggac	765	126
PromAlli_3_R	aaaaaggaaagaacttgactgct	891	
PromAlli_4_F	tatatcccttcctcctctgctt	1004	117
PromAlli_4_R	accaccatttcacttctgttca	1121	
PromAlli_5_F	tagcgtgattagagacgagtca	1208	149
PromAlli_5_R	ttgtggagattgtgaatttgata	1357	
PromAlli_6_F	tatcaaattcacaatctccacaa	1335	261
PromAlli_6_R	agagaaaatccggagaagatcc	1596	
PromAlli_7_F	ggatcttctccggattttctct	1575	224
PromAlli_7_R	ggatctcgaacatccttcaatc	1799	
PromAlli_8_F	aaaggatccccattccatttat	1817	145
PromAlli_8_R	tattacctgcatcgttgccata	1962	
EDS1			
PromEDS1_1_F	ttcagtagttctttggggttcc	82	170
PromEDS1_1_R	tctctttcctcgtctttgaagg	252	
PromEDS1_2_F	cagaaaatggaaggaaaagacc	260	105
PromEDS1_2_R	ctcttaagggttggaatattctgc	365	
PromEDS1_3_F	aaatctcactttgggagtcttctt	672	511
PromEDS1_3_R	ctctttgtcccatcatagttttatgt	1183	

PromEDS1_4_F	acataaaactatgatgggacaaagag	1158	332
PromEDS1_4_R	cagggactactcctgctattgg	1490	
PromEDS1_5_F	gcaaaatcctcccaacctaaa	1490	304
PromEDS1_5_R	tctactaagtggatgcaatcgtg	1794	
PromEDS1_6_F	gcacgattgcatccacttagta	1771	99
PromEDS1_6_R	cttgtgctgatttttgggtgta	1870	
PromEDS1_7_F	caaaaatcagcacaagcctaaa	1855	87
PromEDS1_7_R	ataggaaagctggagaatgcag	1942	
GAPDH			
PromGAPDH_1_F	tgacaaacagagtgccgact	102	199
PromGAPDH_1_R	tggtttctttcatcggctttat	300	
PromGAPDH_2_F	gaacggaagatgattgaacaca	314	250
PromGAPDH_2_R	agggaatttagaggggagaaaa	563	
PromGAPDH_3_F	ctcccctctaaattccctcct	546	207
PromGAPDH_3_R	caaatatttcctcaattggaaagg	752	
PromGAPDH_4_F	ttccaattgaggaaatatttgaa	732	231
PromGAPDH_4_R	caatacacgtgaaggcaagtct	962	
PromGAPDH_5_F	acgctttttggtttcattgagt	990	154
PromGAPDH_5_R	gcaaaactctcaatgacttgga	1143	
PromGAPDH_6_F	tccaagtcattgagagttttgc	1122	220
PromGAPDH_6_R	aatttgcagccgatcgaa	1341	
PromGAPDH_7_F	tgcctttgactttatgcaattcta	1362	172
PromGAPDH_7_R	gttgtaggaaacgagtgcaatg	1533	
PromGAPDH_8_F	attgcactcgtttcctacaaca	1513	149
PromGAPDH_8_R	caagcgattaatctgcaagtga	1661	
PromGAPDH_9_F	gcatacctaccattcggtcatc	1699	195
PromGAPDH_9_R	caacaatctttcgagcaagcta	1893	
PromGAPDH_10_F	tagcttgctcgaaagattgttg	1872	93
PromGAPDH_10_R	ttatcgtttccagtgacagagc	1964	

Annexe III: Observation sur gel des produits PCR obtenus en gradient de température, à partir d'ADN génomique de Golden Delicious et en utilisant les couples d'amorces ciblant les régions promotrices de gènes de défense.

Pour chaque couple d'amorces, le gradient de température d'hybridation s'échelonne de 52.0°C à 62.0°C. Le trait en pointillé représente la taille d'amplicon attendue. Les amorces conclues non fonctionnelles sont barrées d'une croix rouge. La température d'hybridation efficace commune à tous les couples d'amorces est entourée en rouge.



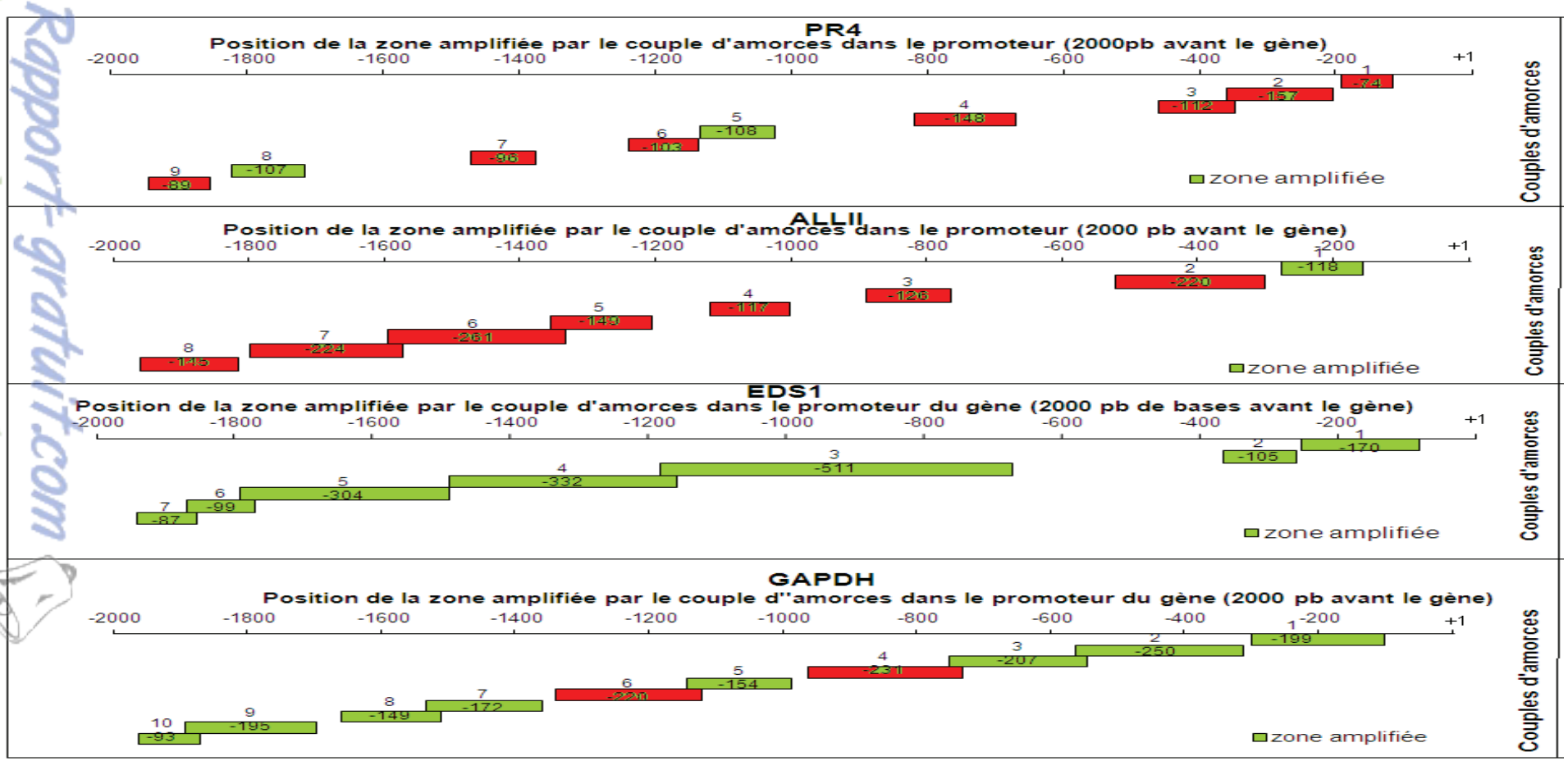


Rapport-Gratuit.com

Annexe IV: Schéma synthétique des couples d'amorces retenus pour l'analyse FAIRE-PCR.

En vert, ceux qui sont gardés et en rouge, ceux qui amplifient à une autre taille que prévue, à deux tailles différentes ou n'amplifient pas du tout.

A l'intérieur des cases, la taille d'amplification attendue.

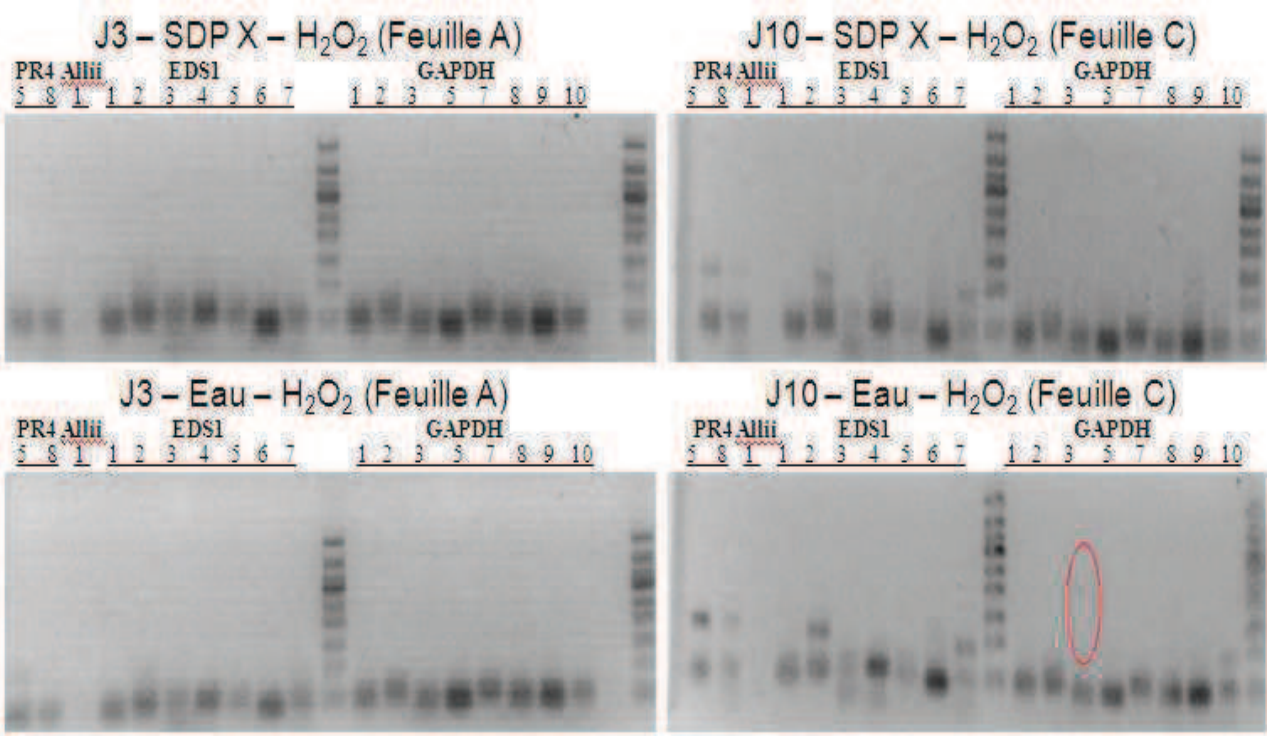


Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Annexe V: FAIRE-PCR sur les échantillons des essais où la potentialisation s'est avérée.

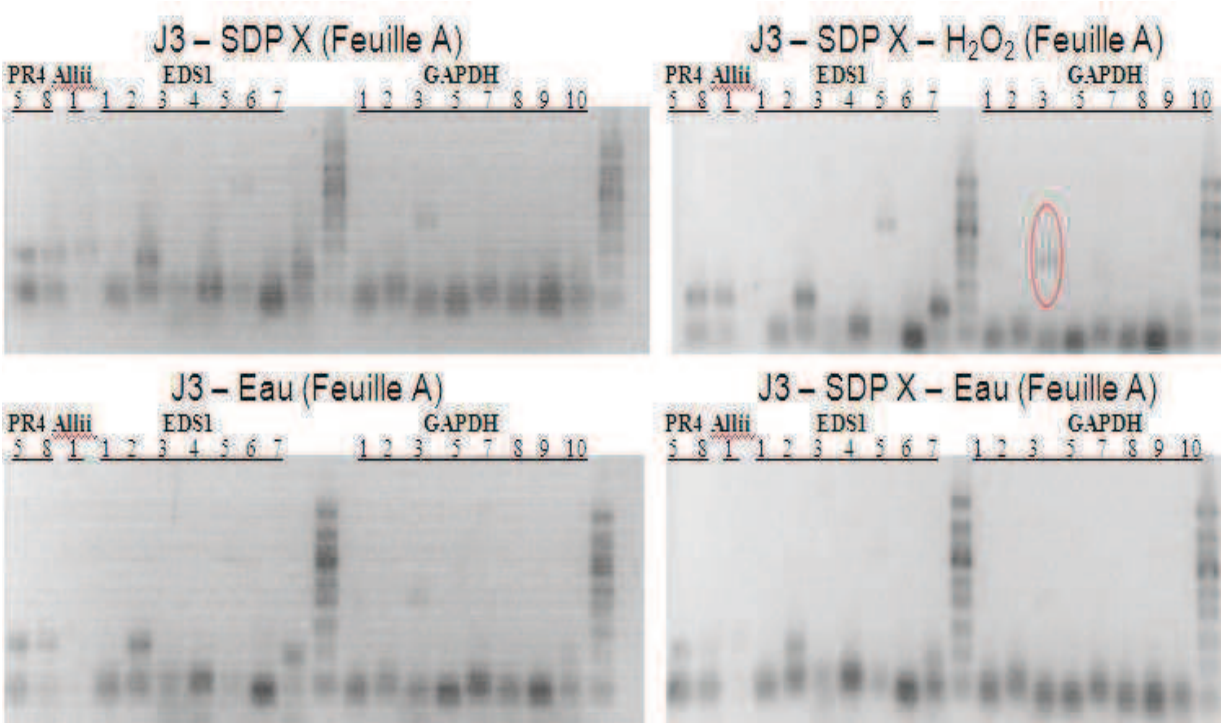
a) Pour le deuxième essai sur semis de Golden

Le SDP X est appliqué ou non à J0 et un traitement à l'H_2O_2 est réalisé ou non 24h avant le prélèvement afin de révéler d'éventuels effets potentialisateurs. Les jeunes feuilles développées traitées sont prélevées à J3, et les feuilles néoformées à J10. Les fractions libres de la chromatine obtenues par la méthodologie FAIRE à partir de ces feuilles sont analysées par PCR, avec les couples d'amorces fonctionnels sélectionnés préalablement ciblant les pomoteurs des trois gènes de défense (PR4, Alliinase et EDS1), ainsi que du gène de référence (GAPDH). Les produits PCR sont séparés sur gel d'agarose et les révélations sous UV permettent de comparer l'amplification des promoteurs des gènes de défense dans les échantillons potentialisés et non.

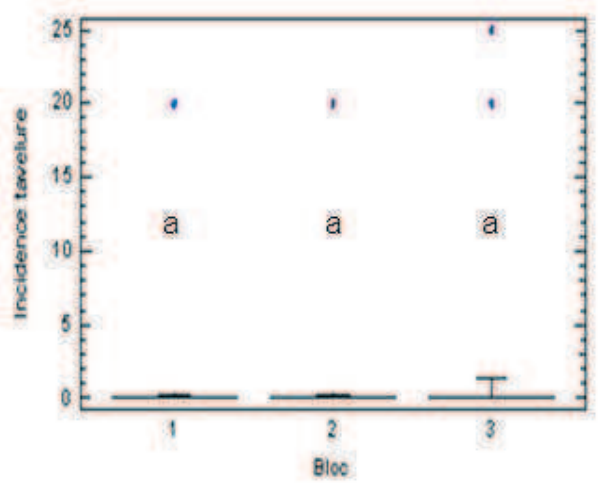


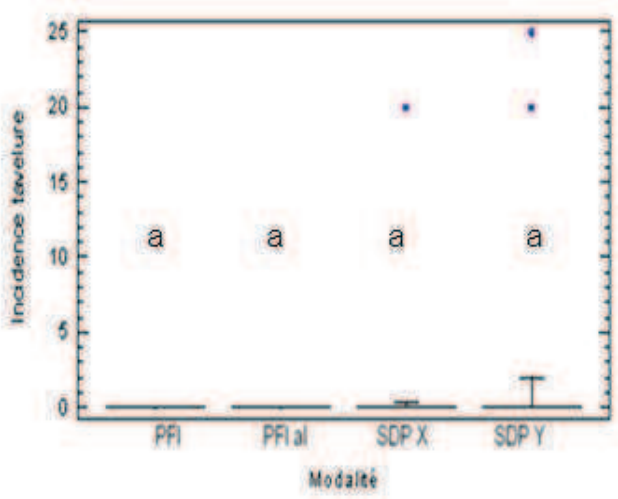
b) Pour l'essai sur scions de Gala

Le SDP X est appliqué ou non à J0et un traitement à l'H_2O_2 est réalisé ou non 24h après afin de révéler d'éventuels effets potentialisateurs. Les jeunes feuilles développées traitées sont prélevées à J3.



Annexe VI: Pouvoir de protection contre la tavelure en verger -Première lecture sur feuilles de rosettes, 4ème passage de SDP

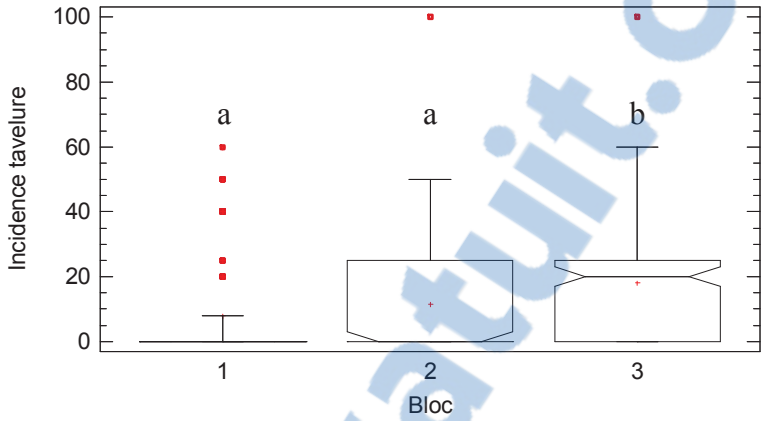




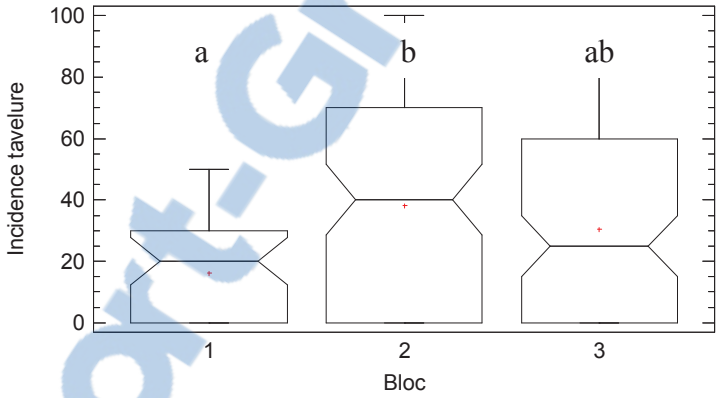
Annexe VII: Boîtes à moustaches comparant les effets blocs sur l'incidence de la tavelure en verger

Lecture sur feuilles au 8ème passage de traitement SDP (A). Lectures sur feuilles (B) et sur fruits (C) au 12ème passage de traitement en SDP. Les lettres indiquent les classes statistiques (Tukey, $p<0.05$).

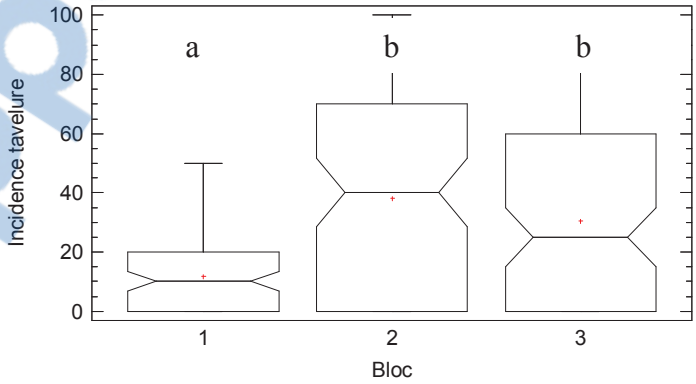
(A)



(B)



(C)



Rapport-Gratuit.com

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

AGRO CAMPUS OUEST – université angers – UNIVERSITÉ DE RENNES 1	**Diplôme / Mention :** Sciences Technologies Santé/ Biologie et Technologie du végétal **Spécialité :** Production et Technologie du Végétal (ProTeV) **Parcours :** Productions Végétales Spécialisées (PVS) **Option :** Filières de l'horticulture et végétal urbain
Auteur : RABENANTOANDRO Fara Henintsoa Date de naissance : 28/12/1987	Organisme d'accueil : INRA Angers-Nantes UMR 1345 - IRHS, Equipe ResPom. Adresse : 42 rue Georges Morel, BP 60057, 49071 Beaucouzé Maître de stage : Alexandre Degrave, MCF Agrocampus Ouest
Nb pages : 27 Annexe(s) : 10 Année de soutenance : 2013	

Titre français : Etude épigénétique de l'effet potentialisateur de stimulateurs de défense (SDP) sur pommier par la méthodologie FAIRE ou Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements, de la serre au verger

Titre anglais : Chromatin modification in the priming by plant defence inducers (PDI) on apples, analyzed with the FAIRE methodology or Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements, from the laboratory to the field

Résumé : En agriculture, la lutte contre les bioagresseurs utilise des pesticides à fort impact environnemental. Les stimulateurs de défense des plantes (SDP), produits non biocides synthétiques ou naturels d'origine diverse, pourraient réduire leur usage. Certains induisent des défenses immédiatement après application. D'autres préparent la plante à mettre en place plus rapidement et plus intensément ses défenses lors d'attaques ultérieures. Ce phénomène appelé « potentialisation » est caractérisé dans la littérature par des modifications d'histones libérant la chromatine au niveau des promoteurs des gènes de défense. La méthodologie FAIRE permet d'extraire cette chromatine libre afin de l'étudier de manière globale par séquençage ou plus ciblée par PCR. L'étude vise ici à vérifier si cette modification épigénétique est observée dans les feuilles de pommier potentialisées par le SDP X, connu pour son effet potentialisateur. Le travail a consisté à déterminer les conditions du FAIRE efficaces sur cette espèce (concentration de formaldéhyde et conditions de sonication), et à préparer des échantillons potentialisés. L'analyse FAIRE-PCR de quelques gènes de défense sur ces échantillons n'a pas pu confirmer que la potentialisation provoque la libération de la chromatine pour faciliter leur expression face à un stress effectif. Au mieux, l'enrichissement en chromatine libre est détecté au niveau de deux régions du promoteur du gène de défense EDS1, mais seulement après l'application du stress. Par ailleurs, le travail a démontré un effet protecteur du SDP X contre la tavelure en verger.

Abstract: Disease control in agricultural practice involves the use of pesticides whose environmental impact is substantial. Plant Defence Inducers (PDI) with no biocidal action and from synthetic or diverse natural origins, could reduce the use of conventional pesticides. Some of these products induce defenses immediately after application. Others prepare defence genes for faster and more robust activation after subsequent attack. This phenomenon called "priming" is characterized in the literature by histone protein modifications on defence genes promoters, that produce open chromatin. The FAIRE is a methodology to extract this open chromatin in order to analyze it in general sequencing, or more targeted PCR. The study aims to verify whether this epigenetic modification is found in apple leaves primed by the SDP X, which has already demonstrated its priming effect in the laboratory. The work has determined the conditions of effective FAIRE on this plant species (formaldehyde concentration and conditions of sonication). It has also enabled the preparation and the selection of necessary primed samples. However, the FAIRE-PCR analysis of targeted defense genes on these samples has not confirmed that the priming causes the release of chromatin to facilitate their expression facing a stress. At the best, open chromatin enrichment was detected at two regions of EDS1 defence gene promoter, but only after the stress application. Besides, the work has demonstrated a protective effect of SDP X against scab in the orchard.

Mots-clés : Potentialisation – Epigénétique - SDP - Tavelure
Key words : Priming – Epigenetics – PDI - Scab