

Voir les discussions, les statistiques et les profils des auteurs de cette publication à l'adresse suivante : <https://www.researchgate.net/publication/281097876>

Résistance au chancre de l'arbre fruitier chez le pommier - Évaluation de la maladie

Symptômes, analyses histopathologiques et RNA-Seq dans différents cultivars, variation génétique de *Neonectria ditis*...

Livre - Août 2015

CITATIONS

0

LIRE

1,684

1 auteur :



Marjan Ghasemkhani

Université suédoise des sciences agricoles

19 PUBLICATIONS 62 CITATIONS

VOIR LE
PROFIL

Tout le contenu de cette page a été téléchargé par [Marjan Ghasemkhani](#) le 19 août 2015.

L'utilisateur a demandé l'amélioration du fichier téléchargé.

Résistance au chancre de l'arbre fruitier chez le pommier

Évaluation des symptômes de la maladie, analyses
histopathologiques et RNA-Seq dans différents
cultivars, variation génétique de *Neonectria ditissima*

Marjan Ghasemkhani

*Faculté d'architecture du paysage, d'horticulture et des sciences de la production
végétale Département de la sélection végétale
Alnarp*

Thèse de doctorat
Université suédoise des sciences agricoles
Alnarp 2015

Acta Universitatis Agriculturae Sueciae

2015:77

Couverture : Fleurs de pommier (photo : T. Larsen), Symptômes de chancre sur un pommier (photo : H. Nybom), Symptômes de chancre sur le tronc principal, Sporodochium de *Neonectria ditissima*, Hyphes fongiques de *N. ditissima* dans le cortex, Hyphes fongiques de *N. ditissima* sous le périderme (quatre dernières photos : M. Ghasemkhani).

ISSN 1652-6880

ISBN (version imprimée) 978-91-576-8352-6

ISBN (version électronique) 978-91-576-8353-3

© 2015 Marjan Ghasemkhani, Alnarp

Impression : SLU Service/Repro, Alnarp

2015

Résistance au chancre de l'arbre fruitier chez le pommier

Évaluation des symptômes de la maladie, analyses histopathologiques et RNA-Seq dans différents cultivars, variation génétique de *Neonectria ditissima*

Résumé

Neonectria ditissima (anciennement *Neonectria galligena*, anamorphe *Cylindrocarpon heteronema*) est l'agent causal du chancre des arbres fruitiers, qui est considéré comme un grave problème économique dans la production de pommes. Ce champignon est étroitement associé à des conditions douces et humides, et le climat a donc un impact important sur sa distribution géographique. Les dégâts importants sur les pommiers sont particulièrement fréquents, par exemple, en Europe du Nord-Ouest. Aucune résistance complète n'a encore été signalée. En outre, aucun gène majeur n'a encore été identifié et la résistance semble être contrôlée principalement par l'action additive des gènes.

Les cultivars de pommier varient significativement en termes de niveau de résistance partielle au chancre du pommier après inoculation artificielle de pousses détachées et/ou d'arbres en pots avec des macroconidies de *N. ditissima*. L'hybride de pommetier interspécifique 'Prairifire' a montré le moins de dégâts, ce qui indique que des sources précieuses de résistance peuvent être trouvées dans les espèces de *Malus*. *Neonectria ditissima* a pu être détecté dans des pommiers infectés artificiellement à l'aide d'un test qPCR basé sur le gène β -tubuline spécifique à l'espèce, deux mois après l'inoculation. Une relation positive entre la biomasse de *N. ditissima* et la taille des lésions induites par le chancre a été observée lors de la quantification dans différents cultivars. L'interaction entre la plante et le pathogène a été étudiée en utilisant la microscopie optique des tissus ligneux du pommier ; des hyphes fongiques ont été trouvés dans tous les types de cellules, et la formation de gel a été observée à la fois dans un cultivar sensible et dans un cultivar résistant, mais l'infection semble progresser plus rapidement dans le cultivar sensible. La variation génétique entre les différents isolats de *N. ditissima* a été étudiée à l'aide de marqueurs SSR et AFLP. Les niveaux comparativement faibles de différenciation génétique entre les vergers indiquent que le flux de gènes est important. Des analyses d'isolats à ascospores uniques provenant des mêmes périthèces suggèrent que ce champignon est hétérothallique et qu'il se croise donc. En outre, une approche génomique ciblée a été appliquée afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés en réponse à l'attaque fongique sur les pommiers. Les données obtenues indiquent que les cultivars de pommiers inoculés par *N. ditissima* présentent une augmentation significative des gènes liés à la défense et des gènes impliqués dans la détoxification, les réactions liées à la peroxydase, le métabolisme des phénylpropanoïdes et le processus de lignification.

Mots-clés : anatomie, gène β -tubuline, mécanisme de défense, variation génétique, système d'accouplement, qPCR, RNA-Seq, transcriptome

Adresse de l'auteur : Marjan Ghasemkhani, SLU, Département de sélection végétale,
P.O. Box 101, 230 53 Alnarp, Suède
Courriel : Marjan.Ghasemkhani@slu.se

Dédicace

À mes parents pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements sans fin. À mon mari pour sa patience, son amour, son amitié et son humour.

L'absence de compréhension ne justifie pas l'absence d'existence.

Ibn Sina

Contenu

Liste des publications	7
Abréviations	11
1 Contexte	13
1.1 Pomme (<i>Malus × domestica</i>)	13
1.1.1 Histoire et origine	13
1.2 Chancre des arbres fruitiers (<i>Neonectria ditissima</i>)	14
1.2.1 Histoire et origine	14
1.2.2 Répartition géographique	15
1.2.3 Morphologie	15
1.2.4 Croissance de <i>N. ditissima</i> dans les tissus du pommier	18
1.2.5 Cycle de vie et infection	18
1.2.6 Symptômes	20
1.3 Gestion du chancre des arbres fruitiers	20
1.3.1 Développement de cultivars de pommes saines	21
2 But et objectifs	23
3 Matériel et méthodes	25
3.1 Matériaux végétaux et fongiques	25
3.2 Estimation de la résistance à <i>N. ditissima</i> dans les cultivars de pommes	26
3.2.1 Procédure d'inoculation	26
3.3 Détection et quantification de <i>N. ditissima</i> par PCR quantitative en temps réel	28
3.3.1 Conception d'amorces et validation de leur spécificité	28
3.3.2 Procédures expérimentales	29
3.4 Histopathologie du chancre sur <i>Malus</i> causé par <i>N. ditissima</i>	29
3.4.1 Procédures expérimentales	29
3.4.2 Évaluation des données	30
3.5 Variation génétique chez <i>N. ditissima</i>	30
3.5.1 Extraction et amplification de l'ADN	30
3.5.2 Analyse des données	30
3.6 Analyse de l'expression génétique à partir de données de séquençage de l'ARN	32

3.6.1	Procédures expérimentales	32
3.6.2	Analyse des données	32
4	Résultats et discussion	35
4.1	Variation entre les cultivars de pommes inoculés avec des spores de <i>N. ditissima</i>	35
4.2	PCR quantitative en temps réel pour la détection et la quantification de <i>N. ditissima</i> dans les cultivars de pommes sensibles et résistants	38
4.3	Histopathologie de l'infection et de la colonisation de cultivars de pommes sensibles et résistants par <i>N. ditissima</i>	39
4.4	Diversité génétique et relations génétiques chez <i>N. ditissima</i>	42
4.5	Identification des gènes différentiellement exprimés dans les cultivars partiellement résistants et sensibles en réponse à l'inoculation de <i>N. ditissima</i>	44
5	Conclusions et perspectives d'avenir	49
	Références	51
	Remerciements	63

Liste des publications

Cette thèse est basée sur les travaux contenus dans les documents suivants, référencés par des chiffres romains dans le texte :

- I **Ghasemkhani M.**, Liljeroth E., Sehic J., Zborowska A. et Nybom, H. (2015). Méthode des pousses de coupure pour l'estimation de la résistance partielle des cultivars de pommiers au chancre de l'arbre fruitier causé par *Neonectria ditissima*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 65(5) : 412-421.
- II Garkava-Gustavsson L., **Ghasemkhani M.**, Zborowska A., Englund J.-E., Lateur M. et van de Weg E. Approches pour l'évaluation de la résistance au chancre européen (*Neonectria ditissima*) du pommier. *Acta Hort.* (sous presse).
- III **Ghasemkhani M.**, Holefors A., Marttila S., Zborowska A., Rur M., Rees-George J., Nybom H., Everett K., Scheper R. et Garkava-Gustavsson L. Detection and quantification of *Neonectria ditissima* in apple trees by real-time quantitative PCR and visualization by microscopy. (Soumis).
- IV **Ghasemkhani M.**, Garkava-Gustavsson L., Liljeroth E. et Nybom H. Assessment of diversity and genetic relationships of *Neonectria ditissima* : the causal agent of fruit tree canker. (Manuscrit).
- V **Ghasemkhani M.**, Canbäck B., Alexandersson E., Nybom H. et Garkava-Gustavsson L. Identification of differentially expressed genes associated with response to fruit tree canker in apple using RNA-Seq analysis. (Manuscrit).

Les documents I et II sont reproduits avec l'autorisation des éditeurs.

La contribution de Marjan Ghasemkhani aux articles inclus dans cette thèse a été la suivante :

- I A planifié et réalisé une partie du travail expérimental avec les coauteurs, effectué toutes les analyses statistiques et rédigé le manuscrit.
- II A effectué le travail expérimental avec les co-auteurs et a participé à la rédaction du manuscrit.
- III A planifié les expériences avec les co-auteurs. A réalisé une grande partie du travail expérimental, effectué toutes les analyses statistiques et rédigé le manuscrit.
- IV A planifié les expériences avec les coauteurs. Il a effectué tous les travaux expérimentaux, évalué et analysé toutes les données et rédigé le manuscrit.
- V A planifié les expériences avec les co-auteurs. Il a effectué tous les travaux expérimentaux, évalué et analysé les données avec l'un des coauteurs (bioinformaticien) et rédigé le manuscrit.

Articles connexes de Marjan Ghasemkhani non inclus dans cette thèse :

- I. **Ghasemkhani M.**, Sehic J., Ahmadi-Afzadi M., Nybom H. et L. Garkava-Gustavsson. Screening for partial resistance to fruit tree canker in apple cultivars. *Acta Hort.* (sous presse).
- II. **Ghasemkhani M.**, Holefors A., Zborowska A., Scheper R., Everett K., Nybom H et Garkava-Gustavsson L. Development of a qPCR detection procedure of fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima*. *Acta Hort.* (sous presse).
- III. Nybom H., Røen Dag., Karhu S., Garkava-Gustavsson L., Tahir I., Haikonen T., Røen K., Ahmadi-Afzadi M., **Ghasemkhani M.** et S. H. Hjeltnes. Prebreeding for future challenges in Nordic apples ; susceptibility to fruit tree canker and storage diseases. *Acta Hort.* (sous presse).

Abréviations

AMOVA	Analyse de la variance moléculaire
ANOVA	Analyse de la variance
AUDPC	Surface sous la courbe de progression de la maladie
BC	Concepts du calendrier chrétien
CYP	Cytochromes P450
dai	jours après l'inoculation
DEGs	Gènes différenciellement exprimés
ELI3-1	Gène 3-1 activé par l'éliciteur
ADNg	ADN génomique
ITS	Espace transcrit interne
KEGG	Encyclopédie de Kyoto sur les gènes et les génomes
LOD	Limite de détection
LSD	Différence la moins significative de Fisher
MEA	Agar d'extrait de malt
<i>MLO12</i>	Locus de résistance au mildiou O 12
ARNm	ARN messager
APC	Analyse en composantes principales
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PR	Liées à la pathogénie
qPCR	Réaction en chaîne de la polymérase quantitative en temps réel
QTL	Loci de caractères quantitatifs
RNA-Seq	Séquençage de l'ARN

1 Contexte

1.1 Pomme (*Malus × domestica*)

La pomme, *Malus × domestica* (L.) Borkh. est un membre de la famille des Rosacées. C'est le quatrième fruit le plus cultivé au monde après les agrumes, le raisin et la banane (O'Rourke, 2003 ; Khachatourians, 2002), et il est cultivé dans les zones tempérées et subtropicales. En raison de sa grande accessibilité, la pomme est également l'un des fruits à feuilles caduques les plus populaires et les plus consommés. Près de la moitié de la production est consommée en tant que fruit frais et la majeure partie du reste est transformée en jus de pomme, en confiture de pomme, en beurre de pomme et en sauce de pomme en conserve. Le charoet (relish de pommes) et les tranches de pommes déshydratées sont d'autres produits commerciaux importants. D'un point de vue médicinal, la pomme fraîche agit comme purgatif, réduit l'incidence des caries dentaires, prévient la constipation, fournit de l'énergie supplémentaire pour les exercices physiques intenses et aide à contrôler l'obésité (Bakhru, 1995).

1.1.1 Histoire et origine

Les archives historiques et les vestiges préhistoriques indiquent l'existence d'une culture et d'une dispersion de la pomme en Asie et en Europe il y a plus de plusieurs milliers d'années. Les pommes étaient largement cultivées au Proche-Orient près de 3000 ans avant J.-C. (Turquie, Syrie, Irak) (Hancock, 2008) et dans l'Empire perse (Iran et au-delà) dès 500 ans avant J.-C. (Hancock, 2008 ; Luby *et al.*, 2003). La culture du pommier s'est ensuite répandue en Europe à travers la Grèce et l'Empire romain. Les pommiers ont rapidement été plantés dans presque toute l'Europe et un grand nombre de cultivars différents ont été identifiés à la fin du siècle 18th (Hancock, 2008 ; Luby *et al.*, 2003 ; Juniper *et al.*, 1996).

À l'aide de marqueurs moléculaires, Harris *et al.* (2002) ont montré que le pommier sauvage *Malus sieversii*, situé en Asie centrale, est le principal contributeur à la pomme domestique. D'autres espèces de *Malus* ont également contribué au pool génétique, à la fois dans les temps anciens et plus récemment

en tant que donneurs de résistance aux ravageurs

et les maladies. Presque tous les cultivars de pommes couramment cultivés sont considérés comme *M. × domestica*, mais certains pommiers (*Malus* spp.) sont encore cultivés, principalement à des fins ornementales et comme donneurs de pollen dans les vergers commerciaux.

Aujourd'hui, la production commerciale de pommes dépasse les 70 millions de tonnes métriques dans le monde, les principaux producteurs étant la Chine, les États-Unis, la Turquie, la Pologne, l'Inde, l'Italie, l'Iran, le Chili, la France et la Russie (FAO, 2013 ; O'Rourke, 2003).

1.2 Chancre des arbres fruitiers (*Neonectria ditissima*)

Plusieurs champignons différents produisent des chancres sur les pommiers et réduisent à la fois le rendement et la croissance, et peuvent finalement conduire à la mort des arbres. Le chancre des arbres fruitiers, causé par le champignon *Neonectria ditissima* (Tul. & C. Tul.) Samuels & Rossman (*Neonectria galligena* (Bres.) Rossman & Samuels anciennement connu sous le nom de *Nectria galligena*), est l'une des maladies les plus importantes des pommiers et est considéré comme un grave problème économique, en particulier dans le nord-ouest de l'Europe (Weber, 2014 ; Rossman & Palm-Hernandez, 2008 ; Rossman *et al.*, 1999).

1.2.1 Histoire et origine

Les premiers rapports sur *Neonectria ditissima* datent probablement d'environ 1880, lorsque deux études sur le chancre putatif des arbres fruitiers ont été publiées ; Goethe (1880) et Hartig (1880) ont fait état d'une maladie similaire sur une sélection d'arbres à larges feuilles, en particulier la plage de cuivre. Les premiers stades de la formation du chancre sur pommier ont été décrits par Wiltshire (1921), qui a signalé que *N. ditissima* peut pénétrer par des fissures, qui se produisent au printemps lorsque les bourgeons se gonflent, après la chute des feuilles en automne et par des lésions produites par le champignon de la tavelure *Venturia inaequalis*. Une description détaillée de la maladie et de l'anatomie des lésions a été fournie par Zeller (1926), tandis que Cayley (1921) a décrit le cycle biologique de *N. ditissima* afin de faciliter l'utilisation de fongicides pendant les périodes de production de spores.

Le chancre du pommier, le chancre de *Neonectria* et le chancre européen sont les noms communs du chancre des arbres fruitiers. Une étude antérieure utilisant les polymorphismes RAPD et de l'ADN ribosomique a montré que ce pathogène est originaire d'Amérique du Nord (Plante *et al.*, 2002). *Neonectria ditissima* appartient à l'embranchement des *Ascomycota*, à la classe des *Sordariomycetes*, à la sous-classe des *Hypocreomycetidae* et à l'ordre des *Hypocreales*. D'après des études phylogénétiques moléculaires et des informations sur la reproduction asexuée et sexuée de *N. ditissima*, ce

pathogène appartient à la famille des *Nectriaceae*, et *Neonectria* est le seul téléomorphe identifié et prouvé de *Cylindrocarpon heteronema* (Chaverri *et al.*, 2011 ; Castlebury *et al.*, 2006). Au cours des 150 dernières années, le nom scientifique de ce

a changé fréquemment et actuellement, *N. ditissima* (Tul. & C. Tul.) Samuels & Rossman a pris le pas sur *N. galligena* (Rossman & Palm-Hernandez, 2008 ; Castlebury *et al.*, 2006).

1.2.2 Répartition géographique

Le chancre des arbres fruitiers a été signalé en Australie, au Chili, en Europe, en Afrique du Sud, en Nouvelle-Zélande et au Japon (Weber, 2014 ; Beresford & Kim, 2011 ; Xu & Robinson, 2010 ; Grove, 1990). Un nombre minimum de jours de précipitations (> 30 %) et cinq mois par an avec des températures spécifiques (> 8 h à 11-16 °C) sont nécessaires pour que ce pathogène provoque un chancre sévère (Beresford & Kim, 2011). Les facteurs climatiques locaux ont un impact perceptible sur la distribution et la sévérité du chancre. Le chancre sévère apparaît fréquemment sur des arbres poussant sur des sols mal drainés, sur des sols présentant des poches mal drainées à basse altitude et sur des sols infertiles à haute altitude (Weber, 2014 ; Brandt, 1964). *Neonectria ditissima* infecte le pommier, le poirier (généralement moins gravement que le pommier) et de nombreux arbres forestiers à bois dur tels que le hêtre, le bouleau, l'érable, le tremble, le cognassier et le caryer (Braun & Craig, 2008 ; Farr *et al.*, 1989 ; Flack & Swinburne, 1977).

1.2.3 Morphologie

Les caractéristiques morphologiques de *N. ditissima* sont observées sur les organes de reproduction asexuée, c'est-à-dire les sporodochies, les conidiophores et les conidies, et sur les organes de reproduction sexuée, c'est-à-dire les périthèces, les asques et les ascospores. Les sporodochies sont constituées de conidiophores (Figure 1), qui sont généralement ramifiés et naissent du mycélium blanc à la surface de l'écorce (Figure 2) (Agrios, 1997).



Figure 1. Sporodochie de Neonectria ditissima.

Le stade asexué de ce pathogène, *Cylindrocarpon heteronema*, produit deux types de conidies : les macroconidies et les microconidies. Les mycéliums entièrement développés produisent des sporodochies à la surface des écorces infectées et mortes (Agrios, 1997). Les macroconidies sont ellipsoïdales ou cylindriques avec des extrémités arrondies, et sont produites à l'extrémité des conidiophores de ces sporodochies (Figure 3). Les microconidies sont plutôt unicellulaires et varient en forme et en taille (Ghasemkhani, 2012). Les macroconidies sont extrêmement infectieuses, alors que le rôle épidémiologique des microconidies n'est pas clair (Weber, 2014 ; Saure, 1961 ; Zeller, 1926).

Les périthèces, la fructification sexuelle de ce champignon, sont produits sur les tissus infectés. Ils sont rouge vif et de taille variable, en fonction des conditions environnementales et de la position sur l'écorce. Les périthèces peuvent être trouvés beaucoup plus tard dans l'année que les sporodochies (Figure 4) (Weber, 2014 ; Lortie, 1964).

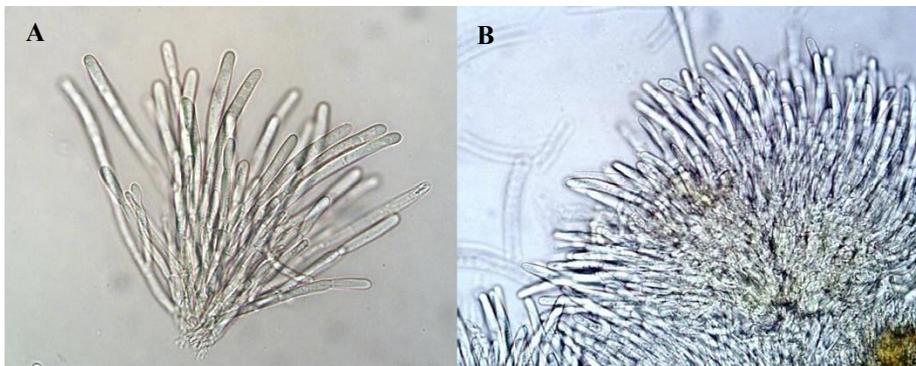


Figure 2. Conidiophores d'un sporodochium produit sur de l'écorce de pommier, A : partie de conidiophore, B : masse densément agrégée de conidiophores.

Les asques de *N. ditissima* sont cylindriques et contiennent huit ascospores (Figure 5A) (Ainsworth & Bisby, 2011 ; Hanlin, 1971). Les ascospores sont bicellulaires, monoseptales et ellipsoïdales, et varient modérément en forme et en taille (Figure 5B). Elles sont libérées au printemps et au début de l'été, mais il y a aussi une courte période de décharge en automne, et peuvent se propager sur de longues distances (Swinburne, 1971). Les conditions climatiques, en particulier l'humidité, ont un impact significatif et il a été rapporté que la libération des ascospores ne se produit pas si les feuilles ne sont pas humides (Wessel, 1979 ; Lortie & Kuntz, 1963 ; Wiltshire, 1921).

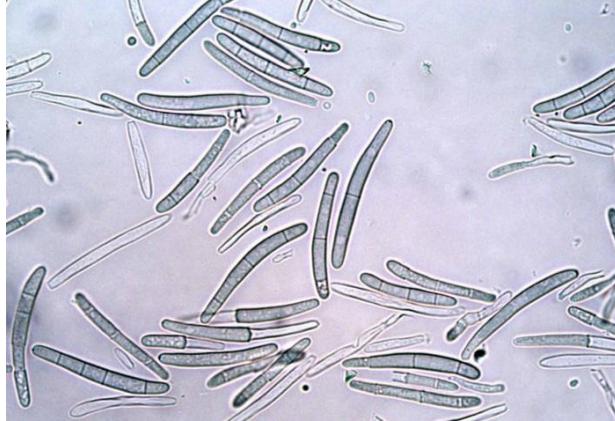


Figure 3. Macroconidies de *Neonectria ditissima* collectées sur l'écorce d'un pommier.



Figure 4. Périthèces de *Neonectria ditissima*, produits pendant l'hiver. Photo : Bruce A. Watt.

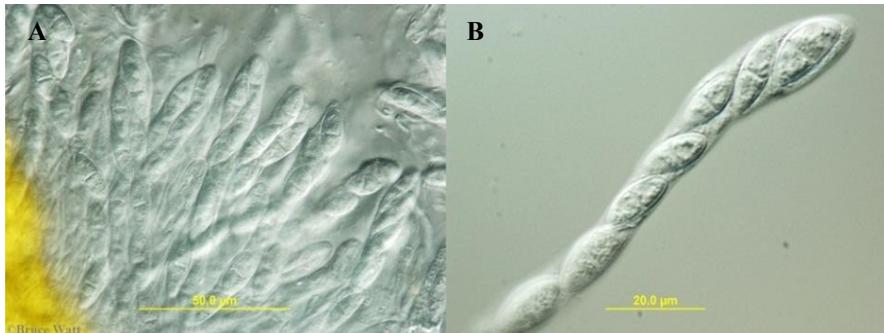


Figure 5. *Neonectria ditissima* produit des asques dans des périthèces, A : ascospores bicellulaires, B : un asque avec 8 ascospores bicellulaires. Photo : Bruce A. Watt.

1.2.4 Croissance de *N. ditissima* dans les tissus du pommier

Selon Crowdy (1949), les hyphes de *N. ditissima* attaquent les vaisseaux, les trachéides et les fibres du xylème, et ont également été détectés à l'intérieur des vaisseaux du xylème (Langrell, 2000). Les hyphes fongiques sont abondants à proximité des sites d'infection et deviennent moins fréquents à mesure que l'on s'éloigne de ces sites (Sakamoto *et al.*, 2004). Le champignon pénètre également dans les tissus mous à l'extérieur du xylème. Les tissus périphériques peuvent être stimulés pour former une barrière de phellogène, qui bloque les tissus vasculaires et aide à limiter l'infection (Clatterbuck, 2006). Cette barrière peut s'effondrer si elle est attaquée par un grand agrégat de mycéliums, probablement en raison de la pression mécanique ou d'une forte concentration de toxines produites par le champignon. Cependant, l'hôte forme rapidement une nouvelle barrière de phellogène et ce processus se répète continuellement (Zeller, 1926). Le champignon peut également pénétrer dans les fibres du phloème après avoir tué les cellules vivantes par la sécrétion de toxines (Crowdy, 1949). Au début de l'infection, les mycéliums se développent à l'intérieur des cellules et se déplacent entre les cellules à travers des piqûres. Plus tard, les mycéliums se développent de manière intercellulaire et les hyphes se développent en spirale autour de petits groupes de fibres à l'intérieur des faisceaux (Crowdy, 1949 ; Zeller, 1926).

1.2.5 Cycle de vie et infection

Neonectria ditissima survit dans les tissus chancreés sous forme de mycélium et de périthèces pendant l'hiver et/ou dans d'autres conditions défavorables. L'infection primaire provient généralement des ascospores au printemps (McCracken *et al.*, 2003 ; Welch, 1934). Lorsque la température est bien au-dessus du point de congélation et qu'il y a suffisamment d'humidité, les sporodochies sont généralement produites au cours de la première année des nouvelles plaies du chancre. Les périthèces se développent et apparaissent généralement à la fin de l'été et en automne (Figure 6). Par conséquent, l'inoculum qui peut provoquer l'infection est disponible t o u t e l ' année, sauf pendant les conditions de gel en hiver ou les périodes extrêmement sèches en été (Weber, 2014 ; Xu & Butt, 1994). Les spores produites par le champignon sont dispersées dans le même arbre et dans les arbres voisins, avec un pic de production des deux types de spores à 10-16 °C en automne (Beresford & Kim, 2011 ; Latorre *et al.*, 2002).

La reproduction et la dissémination de ce pathogène varient cependant considérablement en fonction du climat. Au Chili et aux Etats-Unis, les périthèces sont rarement formés, et la principale source d'inoculum est probablement les conidies (Dubin & English, 1970 ; Crowdy, 1952). Dans le nord de l'Allemagne, une infection sévère peut se produire lorsque les périthèces sont suffisamment matures pour libérer des ascospores pendant la

chute des feuilles en automne (Weber, 2014). Dans les îles britanniques, la plupart des ascospores sont plutôt libérées au printemps (Weber, 2014 ; Swinburne, 1971 ; Munson, 1939).

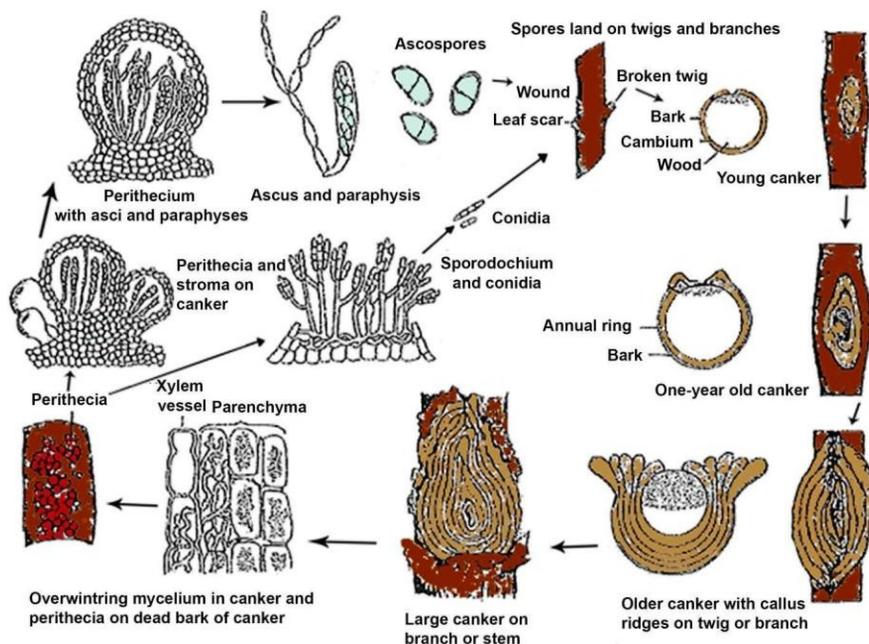


Figure 6. Cycle de vie du chancre des arbres fruitiers causé par *N. ditissima*. Figure modifiée d'après Agrios (1997).

La dissémination des conidies et des ascospores dépend, par exemple, des conditions climatiques telles que les précipitations au cours de la saison et les éclaboussures de pluie, du vent et de l'activité des insectes, qui sont tous considérés comme des porteurs. Les cicatrices foliaires en automne constituent les sites d'entrée les plus importants pour l'infection (Swinburne *et al.*, 1975 ; Saure, 1961 ; Wiltshire, 1921). D'autres blessures, comme les fissures, les blessures dues au gel, les blessures dues à la taille en hiver et en été, les blessures causées par les insectes ou par la cueillette des fruits, et les lésions dues à la tavelure, peuvent également servir de sites d'entrée pour l'infection (Weber, 2014 ; Pijut, 2006 ; Mols & Boers, 2001 ; Dewey & Swinburne, 1995 ; Swinburne, 1971 ; Dubin & English, 1970 ; Kennel, 1963 ; Saure, 1961). Différents types de blessures, naturelles ou artificielles, sont présentes sur les arbres tout au long de l'année, et les spores peuvent croître et germer instantanément, et s'établir dans les tissus de l'écorce en 3 à 4 heures (Xu *et al.*, 1998 ; Brandt, 1964). Les conidies peuvent se propager pendant la saison de croissance à d'autres arbres et ce cycle se répète plusieurs fois.

Une étude précédente a montré que 50 et 5000 macroconidies par cicatrice foliaire provoquent respectivement 20% et 90% d'infection (Dubin & English, 1970) alors que 100 macroconidies sur des plaies de taille fraîches sont nécessaires pour provoquer 32% d'infection (Xu *et al.*, 1998). Parfois, les

blesures ne sont pas suffisamment profondes pour que l'infection soit réussie.

la pénétration du champignon, et l'infection est limitée au cortex (Wiltshire, 1921). Après la pénétration initiale de *N. ditissima* et l'établissement de l'infection, le cal de blessure se développe autour de la zone infectée afin d'empêcher la propagation de l'infection dans de nouveaux tissus.

1.2.6 Symptômes

Neonectria ditissima peut infecter des arbres de tous âges. Les premiers symptômes d'infection sur les branches et les tiges de pommier consistent en de petites taches rougeâtres foncées dans une zone entourant le site d'infection. Des zones en creux peuvent se développer autour des sites infectés, par exemple à la base des pousses, sur les cicatrices foliaires et les blessures (figure 7A) (Crowdy, 1949).

Les grandes lésions sur les branches principales ou les tiges proviennent généralement d'une infection à la base des pousses latérales qui se sont étendues aux branches principales. L'hôte forme des barrières de phellogène autour des sites infectés en réponse à l'infection, ce qui provoque un gonflement de la zone (Beltra *et al.*, 1969). Des crêtes concentriques sont observées dans le bois exposé des vieux chancres, causées par des différences dans le taux de croissance saisonnier du champignon et de l'hôte (Figure 7B) (Crowdy, 1949). Les coupes transversales des branches infectées montrent généralement une zone de brunissement dans le bois, et des hyphes de *N. ditissima* peuvent être détectées dans la lumière des vaisseaux du xylème (Weber, 2014 ; Ventura *et al.*, 2004 ; Dewey & Swinburne, 1995). Des masses de spores conidiennes, ressemblant à des fructifications blanches, peuvent être identifiées sur les jeunes pousses cannelées en été et au début de l'automne, tandis que les périthèces sont reconnus comme des fructifications rouges au printemps, en automne et en hiver (Weber, 2014 ; Crowdy, 1949).

Neonectria ditissima peut également provoquer la pourriture des fruits, mais les symptômes sont rarement observés avant la récolte. Pendant le stockage, les symptômes peuvent se développer sur toutes les parties du fruit, et la peau de la zone pourrie devient brun foncé (Weber, 2014).

1.3 Gestion du chancre des arbres fruitiers

La lutte contre le chancre des arbres fruitiers est difficile car le champignon produit des spores tout au long de l'année et il y a toujours des sites d'entrée appropriés sur les pommiers pour l'infection. Une combinaison de méthodes, comprenant des procédures de gestion des vergers, des traitements chimiques et le choix de cultivars relativement résistants, est nécessaire pour maintenir la maladie sous contrôle, au moins partiellement. Ces procédures comprennent la coupe de tous les tissus infectés et le recouvrement des plaies avec un désinfectant dès qu'un arbre infecté a été détecté lors de la taille d'hiver. Un

certain nombre de produits chimiques comme la pâte de Bordeaux, le Copper-Count-N et le Cuprofix Ultra 40 ont été utilisés sur les chancres pour contrôler les dégâts (Cooke, 1999 ; English *et al.*, 1979 ; Swinburne *et al.*, 1975), de même que la pulvérisation des arbres avec, par exemple, de l'oxychlorure de cuivre (Cooke *et al.*, 1993), mais ces produits chimiques ne sont pas autorisés par les autorités compétentes.

dans un nombre croissant de pays. Scaniavital Kambium, un produit suédois fabriqué à partir d'une pâte naturelle dérivée du fond marin et contenant de la silice, du calcium et divers composants organiques, a été commercialisé pour le traitement du chancre des arbres fruitiers (www.nordiskalkali.se). Malheureusement, aucune de ces procédures de protection n'est suffisante, et il devient particulièrement difficile de contrôler la maladie si elle est déjà établie dans les jeunes arbres des vergers nouvellement plantés (Cooke, 1999 ; Swinburne *et al.*, 1975).



Figure 7. A : zone creuse autour des premiers symptômes sur de jeunes branches infectées par *N. ditissima*, B : anneaux concentriques typiques d'une infection de chancre plus ancienne.

1.3.1 Développement de cultivars de pommes saines

Il est bien connu que les espèces de *Malus* et les cultivars de pommiers présentent des niveaux variables de résistance au chancre des arbres fruitiers (Sasnauskas *et al.*, 2006 ; Kozlovskaya *et al.*, 1999 ; Lateur & Populer, 1994 ; van de Weg, 1989), et certains des cultivars traditionnels de pommes à cidre sont comparativement résistants, de même que certains porte-greffes comme 'M.1' et 'M.12' (Moore, 1960). Cependant, une résistance complète n'a pas encore été signalée (Ghasemkhani *et al.*, 2015 ; Garkava-Gustavsson *et al.*, 2013 ; van de Weg, 1989 ; van de Weg, 1987) et il existe peu de programmes de sélection végétale axés sur le développement de génotypes de pommiers présentant des niveaux élevés de résistance à ce pathogène.

Le niveau de résistance est généralement associé au mode d'hérédité. La résistance monogénique ou oligogénique est contrôlée par un ou quelques gènes à effet majeur (également connue sous le nom de résistance qualitative ou verticale), tandis que la résistance polygénique est contrôlée par de

nombreux gènes dont chacun a un effet phénotypique restreint (résistance quantitative ou horizontale) (Balconi *et al.*, 2012 ;

Baker & Cook, 1974). Dans la résistance qualitative, la plupart des gènes R déterminés sont hérités de manière dominante, mais cela peut varier en fonction de l'isolat pathogène (Roelfs, 1988), du phénotype de la maladie (Johnson, 1992), du fond génétique ou de l'environnement (Balconi *et al.*, 2012). Ces gènes sont souvent spécifiques à une race, assurant une protection totale jusqu'à ce qu'il y ait une rupture de la résistance, comme cela s'est produit avec le gène *Vf* contre la tavelure du pommier (Bénaouf & Parisi, 2000 ; Parisi *et al.*, 1993). Cependant, aucune résistance spécifique au gène R n'a été observée contre le chancre des arbres fruitiers.

En revanche, la résistance quantitative n'offre généralement qu'une résistance partielle (Yang *et al.*, 1997). Le rôle de loci spécifiques dans ces caractères peut être étudié par l'identification et la cartographie génétique des QTL (quantitative trait loci) (Balconi *et al.*, 2012 ; Talukder *et al.*, 2004). Il est possible qu'un nombre limité de QTL majeurs soit impliqué dans la résistance au chancre du pommier (van de Weg & Jansen, 1989), et une étude plus récente a démontré que la résistance au chancre du pommier est contrôlée principalement par l'action additive des gènes (Gelvonauskiene *et al.*, 2007).

2 But et objectifs

La plupart des études ont été menées sur l'épidémiologie de cette maladie et il y a peu d'études sur la résistance de la plante hôte, alors que d'autres aspects de la résistance restent peu clairs. En outre, le mécanisme de résistance des cultivars de pommier au chancre de l'arbre fruitier est mal compris. Dans ce travail de thèse, la sensibilité de différents cultivars de pommiers au chancre de l'arbre fruitier a été étudiée. En outre, des études sur la détection, la quantification de ce champignon et l'interaction plante-pathogène dans des arbres infectés artificiellement, ainsi que sur la variation génétique du pathogène, ont été réalisées. La dernière étape consistait à élucider la manière dont la défense du pommier est affectée par ce pathogène au niveau moléculaire. Les objectifs plus spécifiques étaient les suivants

- Déterminer les niveaux de résistance au chancre de l'arbre fruitier dans une collection de germoplasmes de pommiers en utilisant l'inoculation de spores de *N. ditissima* à deux reprises.
différents modèles de plantes : des pousses détachées et des arbres en pot, respectivement.
- Détecter et quantifier la biomasse de *N. ditissima* dans les cultivars de pommes à chancre et analyser l'association entre l'ADN du pathogène et la biomasse de *N. ditissima*.
dans différents cultivars de pommes et différents niveaux de sévérité de la maladie.
- Étudier l'ultrastructure de l'interaction plante-pathogène par microscopie afin d'améliorer la compréhension de la résistance partielle à l'*azote*.
ditissima.
- Évaluer la variation génétique de *N. ditissima* entre et au sein des vergers de pommiers et étudier le système de reproduction à l'aide de SSR et d'AFLP.

marqueurs.

- Appliquer l'analyse RNA-Seq pour identifier les gènes différentiellement exprimés qui peuvent aider à élucider les mécanismes à l'origine de la résistance. vers *N. ditissima* dans le pommier.

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériaux végétaux et fongiques

Les cultivars de pommes couramment cultivés dans les pays nordiques et présentant un intérêt potentiel pour les programmes de sélection ont été utilisés avec quelques cultivars internationaux et/ou spéciaux à d'autres égards.

Pour les expériences d'inoculation de spores sur pousses détachées, des pousses dormantes ont été prélevées sur des arbres du verger génétique de Balsgård (N 56°6', E 14°9'), Université suédoise des sciences agricoles, dans le sud de la Suède, et sur un cultivar en Finlande. Les pousses ont été conservées au froid (+4 °C) de la collecte à quatre jours avant l'inoculation et aucun fongicide n'a été appliqué.

Pour les expériences d'inoculation de spores sur des arbres en pot, des pommiers d'un an greffés sur le porte-greffe M9 ont été produits dans une pépinière suédoise à partir de greffons provenant de Balsgård. Les arbres en pot ont été conservés dans une serre non chauffée et arrosés chaque semaine. Aucun fongicide ni engrais n'a été utilisé.

Pour les expériences de qPCR, l'histopathologie et l'étude de l'expression des gènes, des arbres d'un an ont été produits et manipulés comme décrit précédemment.

Pour l'étude de la variation génétique, des isolats à une seule ascospore ont été produits à partir de périthèces prélevés sur des chancres naturels sur des branches de pommiers collectées dans sept vergers du sud de la Suède et dans un verger en Belgique (tableau 1).

Afin de préparer la suspension de spores pour les expériences d'inoculation de spores, des sporodochies de *N. ditissima* provenant de chancres naturels sur des branches de pommiers ont été collectées dans les vergers de Balsgård. Les macroconidies de *N. ditissima* ont été distinguées sur la base de leurs caractéristiques morphologiques et une suspension de macroconidies a été obtenue. La concentration a été ajustée à 1×10^5 conidies mL⁻¹.

Pour les études de qPCR et d'expression génique, la suspension

macroconidienne, telle que décrite précédemment, a été cultivée sur un milieu agar (1,5 %). Le jour suivant, des

Les macroconidies ont été cultivées sur un milieu gélosé (1,5 %) pour produire des sporodochies. Plus tard, les sporodochies produites ont été utilisées pour les suspensions de spores.

Tableau 1. Origine géographique des isolats de *N. ditissima* utilisés dans cette étude

Nombre de isolats	Verger	Latitude et longitude	Année
3	Jonstorp, Suède	(N 56°13', E 12°40')	2013
2	Julita, Suède	(N 59°11', E 16°1')	2013
2	Jönköping, Suède	(N 57°46' N, E 14°9')	2013
2	Kivik, Suède	(N 55°41', E 14°13')	2013
26	Balsgård, Suède	(N 56°6', E 14°9')	2013
3	Bjärred, Suède	(N 55°43' , E 13°1')	2013
4	Gembloux, Belgique	(N 54°34', E 4°42')	2014
2	Stockholm, Suède	(N 59°19', E 18°4')	2014

Isolateur : Marjan Ghasemkhani

3.2 Estimation de la résistance à *N. ditissima* dans les cultivars de pommes

Dans la première étude (Paper I), les différences génétiques dans la résistance au chancre de l'arbre fruitier ont été étudiées chez 30 cultivars de pommiers, qui ont été examinés en utilisant des pousses coupées inoculées par blessure dans une serre standard pendant deux ans (2012 et 2013). Onze de ces cultivars de pommes ont également été inoculés dans une serre avec un contrôle climatique avancé (biotron) afin d'évaluer la robustesse de la méthode. Dans la seconde étude (Paper II), la correspondance des résultats sur la résistance/susceptibilité entre les années et entre deux modèles de plantes (pousses coupées et arbres d'un an) a été vérifiée sur 15 cultivars.

3.2.1 Procédure d'inoculation

Dans la première expérience, les pousses ont été transférées dans une serre standard à Balsgård et dans une serre à contrôle climatique avancé à Alnarp (biotron) quatre jours avant l'inoculation, et ont été placées dans des bouteilles en verre de 1L. Les bouteilles en verre ont été conservées sous une tente en plastique à Balsgård (figure 8A) et dans une chambre à Alnarp. Trois bourgeons axillaires de chaque pousse ont été inoculés avec la suspension de spores. Une gelée de pétrole blanche a été utilisée pour couvrir les plaies afin de les protéger immédiatement après l'inoculation (Figure 8B), et a été enlevée avec du papier de soie quatre jours plus tard.

Dans une deuxième étude, des arbres d'un an et des pousses coupées ont été

conservés dans une serre non chauffée et dans le biotron d'Alnarp, respectivement. Ils ont été inoculés comme décrit précédemment. Pour l'évaluation du pourcentage d'infection,

une autre série d'arbres âgés d'un an a été conservée sur le terrain pendant la chute naturelle des feuilles. Ces arbres ont été soumis à une irrigation par aspersion à un régime de précipitations normal pour un automne suédois (20 mm/jour). Plus de détails sur les procédures sont fournis dans les documents I et II.

3.2.2 Évaluation des données et analyse statistique

Dans la première étude (document I), la longueur des lésions a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse numérique en cinq points à des intervalles de temps précis : cinq jours pour les deux années dans la serre standard et dans le biotron en 2013 ; et sept jours dans le biotron en 2012. Au total, 90 et 120 évaluations ont été obtenues dans la serre standard et dans le biotron (3 et 4 pousses × 2 répétitions dans le temps × 3 cicatrices foliaires/pousses × 5 évaluations), respectivement, pour chaque cultivar et chaque année.

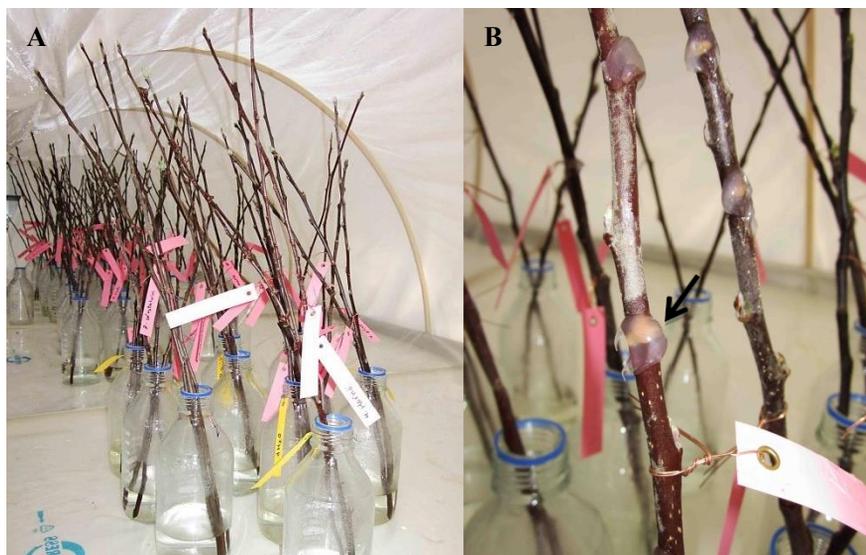


Figure 8. A : pousses de pommier coupées sous une tente en plastique dans une serre standard à Balsgård, B : les blessures ont été recouvertes de vaseline blanche juste après l'inoculation.

Le niveau de résistance partielle a été quantifié de trois manières différentes pour les 11 cultivars évalués dans les deux installations : pourcentage d'infection, période d'incubation et surface sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC). Des ANOVA à deux voies distinctes ont été calculées pour ces trois variables, les effets étant attribués au cultivar, à l'année, à la répétition et à l'installation. Des tests de corrélation de Pearson ont été effectués afin d'étudier la correspondance entre les réplicats des deux installations. Une série d'ANOVA à sens unique a été calculée pour les 30

cultivars des deux années dans la serre standard en utilisant les valeurs AUDPC, et un test post-hoc LSD a été effectué.

pour comparer les cultivars. En outre, des tests de corrélation de Pearson ont été appliqués pour examiner la correspondance des résultats entre les années.

Dans la seconde étude (Paper II), une ANOVA à sens unique a été calculée pour chaque modèle de plante (pousses coupées et arbres en pots) séparément. Une ANOVA à deux voies a été réalisée avec l'AUDPC comme facteur dépendant, et le cultivar et l'année comme variables indépendantes pour les deux modèles de plantes, et un test de Tukey a été utilisé pour comparer les cultivars. Des tests de corrélation de Pearson ont été appliqués pour étudier les relations entre deux modèles de plantes sur deux années avec les valeurs AUDPC. Le pourcentage d'infection des arbres d'un an a été évalué en divisant la proportion de cicatrices infectées par le nombre total de cicatrices foliaires. Le test de corrélation de rang de Spearman a été effectué pour étudier les relations possibles entre les deux années pour chaque modèle, et entre l'AUDPC et le pourcentage d'infection. Les calculs ont été effectués à l'aide de SAS version 9.3, Minitab version 16 et Excel.

3.3 Détection et quantification de *N. ditissima* par PCR quantitative en temps réel

Dans cette partie de la thèse (Paper III), la spécificité des paires d'amorces nouvellement conçues a été étudiée. Une paire d'amorces, qui a passé plusieurs tests de validation, a ensuite été utilisée pour quantifier la biomasse de *N. ditissima* dans les arbres à chancres de cultivars de pommiers infectés artificiellement.

3.3.1 Conception d'amorces et validation de la spécificité des amorces

Les paires d'amorces ont été conçues à partir d'un gène de β -tubuline en alignant les régions conservées au sein de *N. ditissima* avec les informations sur les séquences de différents champignons qui ont été déposées dans GeneBank. Plusieurs combinaisons d'amorces ont été comparées à l'aide d'une analyse *in silico*. Deux ensembles d'amorces ont été utilisés pour une évaluation future.

L'ADN génomique de *N. ditissima* a été amplifié avec les paires d'amorces conçues et les produits PCR obtenus ont été purifiés, séquencés et assemblés. Les séquences assemblées ont été alignées sur les séquences d'ADNg de *N. ditissima*. Dans l'étape suivante, des ADN de *N. ditissima* extraits de différents isolats (tableau 2 du document III) et de différents pathogènes fongiques trouvés sur le bois de pommier (Gomori, 1955) (tableau 1 du document III) ont été utilisés pour évaluer la spécificité des amorces, mise en évidence par la présence ou l'absence d'un seul produit PCR de l'ADNg de *N. ditissima*. Enfin, les courbes de fusion avec un seul pic élevé pendant l'essai qPCR ont été évaluées. Cette méthode a également été utilisée pour la détection de *N.*

ditissima et pour l'étude de l'association entre l'accumulation de l'ADN du pathogène et la taille des lésions des cultivars de pommiers infectés.

La pente d'une courbe standard a été utilisée pour estimer l'efficacité d'amplification de la meilleure paire d'amorces en utilisant une dilution en série de l'ADNg de *N. ditissima*, et la limite de détection (LD) de *N. ditissima* a été déterminée en analysant un total de 60 échantillons.

3.3.2 Procédures expérimentales

Pour la quantification de *N. ditissima* dans les cultivars de pommiers infectés, des pommiers d'un an représentant six cultivars, à la fois sensibles et partiellement résistants, avec trois répliques (arbres) de chaque cultivar, au total 18 arbres, ont été conservés dans une serre non chauffée et inoculés avec une suspension de macroconidies. Les échantillons ont été prélevés à deux moments différents : un mois après l'inoculation et deux mois après l'inoculation, à la fois au point d'infection et dans la zone entourant le point d'infection. Les ADN ont été extraits et un test qPCR a été réalisé. Les réactions ont été effectuées dans 20 µL à l'aide de plaques PCR à 96 puits de 0,2 ml. Pour l'amplification de l'ADN de *N. ditissima* et de l'ADN de pomme, les paires d'amorces conçues et les amorces du gène de l'ubiquitine décrites par Botton *et al.* (2008) ont été utilisées, respectivement. De plus amples détails sur les procédures sont fournis dans le document III.

3.3.3 Évaluation des données et analyse statistique

L'analyse des données qPCR a été effectuée par le logiciel Bio-Rad CFX manager Software v.

3.0.1. La corrélation de Pearson a été utilisée pour évaluer la relation entre la taille des lésions et la quantité relative d'ADN de *N. ditissima* dans les six cultivars. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2013).

3.4 Histopathologie du chancre sur *Malus* causé par *N. ditissima*

Afin de comprendre comment les cultivars de pommiers peuvent se défendre contre le chancre de l'arbre fruitier, l'interaction plante-pathogène a été comparée dans un cultivar sensible et un cultivar partiellement résistant.

3.4.1 Procédures expérimentales

Une étude en microscopie optique a été entreprise sur 'Cox's Orange Pippin' choisi comme cultivar sensible, et sur 'Santana' choisi comme cultivar partiellement résistant. Des arbres en pot d'un an et des pousses coupées ont été inoculés et échantillonnés au site d'infection, 110 jours après l'inoculation (arbres), et 5, 18, 29 et 36 jours après l'inoculation (pousses coupées).

Les échantillons ont été trempés dans un fixateur (2 % (p/v) de paraformaldéhyde, 2,5 % (v/v) de glutaraldéhyde dans un tampon Na-

phosphate 0,1 M, pH 7,2) sous une légère agitation. Les échantillons fixés ont été déshydratés et inclus dans la résine de Spurr. Semithin

ont été coupées et placées sur des lames d'objet pour la microscopie optique. La coloration au bleu de toluidine a été utilisée pour observer la structure générale et les hyphes fongiques. De plus amples détails sur les procédures techniques sont fournis dans le document III.

3.4.2 Évaluation des données

Les coupes ont été examinées à l'aide d'un microscope optique Leica DMLB et, après avoir déterminé l'emplacement d'intérêt, des photographies ont été prises à l'aide d'un appareil photo numérique Leica DFC450.

3.5 Variation génétique chez *N. ditissima*

Dans cette partie de la thèse, la diversité génétique de *N. ditissima* a été évaluée en utilisant des isolats à une seule ascospore provenant de différents vergers (Document IV). Des isolats d'ascospores uniques provenant du même périthèce ont été utilisés pour tirer des conclusions sur le système de reproduction de ce pathogène.

3.5.1 Extraction et amplification de l'ADN

Des isolats à une seule ascospore ont été obtenus à partir de périthèces sur des morceaux d'écorce et de bois collectés dans différents vergers en Suède et en Belgique (Tableau 2). Afin d'extraire l'ADN de ces isolats, des cultures fongiques sur MEA 2% (Figure 9) ont été transférées dans un milieu liquide extrait de malt/glucose/peptone (MGP) (Shaner & Finney, 1977) et incubées pendant 10 jours (Figure 10). Le mycélium a été récolté, lavé avec du dH₂O et lyophilisé. Les ADN ont été extraits et la quantité et la qualité ont été contrôlées.

Sept paires d'amorces SSR (Marra & Corwin, 2009) ont été utilisées pour l'analyse SSR. L'ADN génomique a été amplifié par PCR.

L'analyse AFLP de l'ADN a été réalisée à l'aide d'un kit AFLP d'empreinte microbienne. Onze combinaisons d'amorces ont été utilisées. La reproductibilité de l'amplification AFLP a été vérifiée en ajoutant 5 à 8 échantillons prélevés au hasard dans chaque plaque à 96 puits.

Les produits PCR ont été séparés sur un analyseur d'ADN ABI 3130xl et le logiciel Gene-Marker v 1.85 a été utilisé pour l'analyse des fragments. De plus amples détails sur les procédures expérimentales sont fournis dans le document IV.

3.5.2 Analyse des données

Les paramètres de diversité génétique, à savoir le nombre de loci polymorphes (NPL), la diversité génétique de Nei (H), le pourcentage de loci polymorphes (PPL) et l'indice d'information de Shannon (I) ont été évalués. L'analyse de la

variance moléculaire (AMOVA) a été réalisée afin de répartir la variation génétique en composantes intra- et inter-populations. Les similarités génétiques par paire entre les

La similarité entre les isolats à un seul ascospore obtenus à partir du même périthèce ou de périthèces différents a été estimée à l'aide des coefficients de similarité de Jaccard (Weising *et al.*, 2005). La similarité entre les isolats provenant du même verger ou de vergers différents a été illustrée par un dendrogramme construit avec UPGMA et une analyse en composantes principales (PCoA). Des tests de Mantel (Mantel, 1967) ont été effectués afin de vérifier l'adéquation de l'analyse de cluster avec la matrice sur laquelle elle était basée, et d'étudier la corrélation possible entre deux matrices de distance génétique basées sur les marqueurs SSR et AFLP, respectivement. Les calculs ont été effectués à l'aide de POPGENE v 1.32 (Yeh *et al.*, 1997), NTSYS 2.02 (Tamura *et al.*, 2007) et Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). De plus amples détails sur les calculs statistiques sont fournis dans l'article IV.

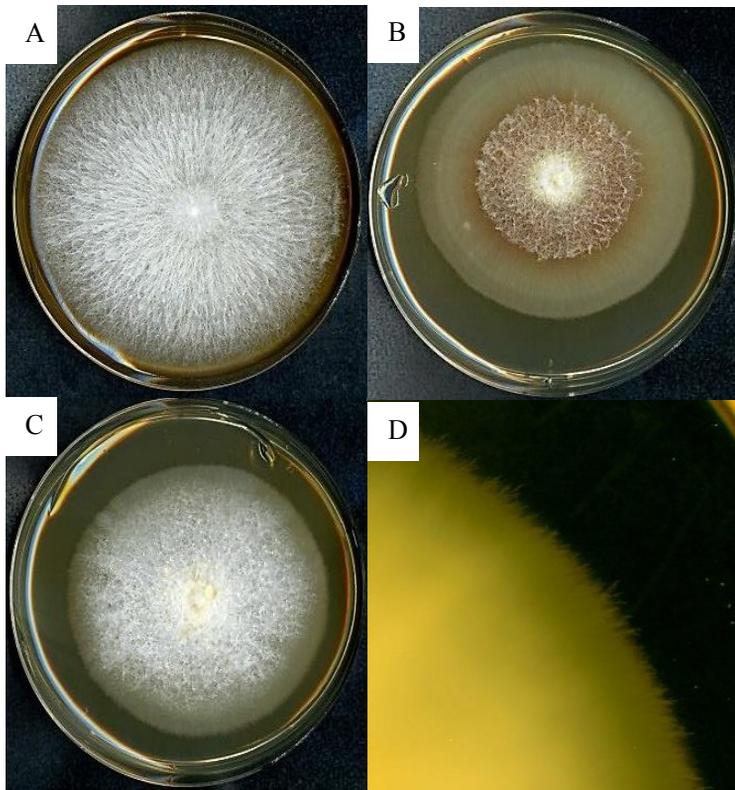


Figure 9. *Neovectria ditissima*, culture sur gélose à l'extrait de malt 2%. A, B, C : Cultures fongiques avec un mycélium circulaire. D : Marge d'érosion d'une culture fongique.

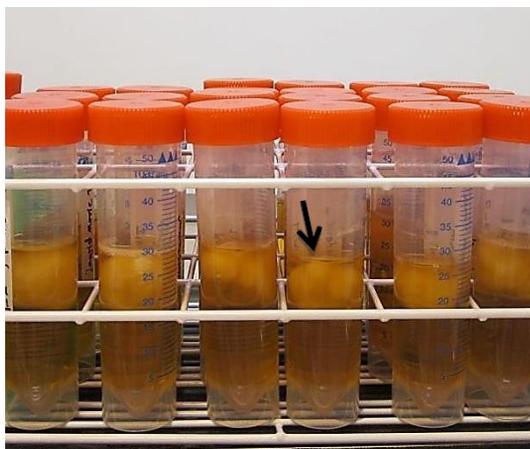


Figure 10. Différents isolats de *Neonectria ditissima* se développant en milieu liquide.

3.6 Analyse de l'expression génétique à partir de données de séquençage de l'ARN

Les gènes différentiellement exprimés, qui pourraient être pertinents pour la résistance au chancre de l'arbre fruitier chez le pommier, ont été étudiés à l'aide d'une analyse RNA-Seq (document V).

3.6.1 Procédures expérimentales

Les arbres de deux cultivars, le 'Jonathan' partiellement résistant et le 'Prima' sensible, ont été inoculés avec *N. ditissima* comme décrit précédemment (Paper III) et avec de l'eau comme contrôle. Des échantillons de tissus ont été prélevés à trois moments différents, à savoir 5, 15 et 30 jours. Au total, 36 échantillons de tissus provenant des deux cultivars de pommier différents à trois moments différents, chacun avec deux inoculations (*N. ditissima* et eau) en trois répétitions (arbre), ont été utilisés pour l'extraction de l'ARN. La concentration, la pureté et l'intégrité des ARN ont été déterminées, et des bibliothèques ont été générées avec 1 µg d'ARN total en utilisant Illumina TruSeq Stranded mRNA, multiplexées et séquencées sur deux voies en mode Illumina HiSeq High Output.

3.6.2 Analyse des données

La qualité des lectures a été déterminée à l'aide du logiciel fastQC version 0.11.2 (Andrews, 2010). Les séquences adaptatrices ont été supprimées avec Trimmomatic, version 0.32 (Bolger & Giorgi, 2014) en même temps que les séquences de faible qualité. Afin d'éliminer les lectures fongiques, les lectures ont été mises en correspondance avec le génome de référence du pommier, assembly version 1 (Velasco *et al.*, 2010), ainsi qu'avec le génome de

référence du champignon *Nectria haematococca* (Coleman *et al.*, 2009) à l'aide de TopHat2, version 2.0.13 (Trapnell *et al.*, 2009). Un nombre très limité de

nombre de lectures fongiques identifiées ont été supprimées. Les lectures filtrées ont ensuite été utilisées pour la suite de l'analyse. HTseq-count, version 0.6.1 (Anders *et al.*, 2014), a été utilisé pour le calcul du nombre de lectures par gène. La normalisation et l'analyse de l'expression différentielle ont été effectuées conformément au modèle et au progiciel DESeq2 (Love *et al.*, 2013 ; Anders & Huber, 2010). Un seuil d'identification des gènes significativement exprimés de manière différentielle dans chaque cultivar a été basé sur la fixation du taux de fausse découverte (FDR) à $\leq 0,05$. De plus amples détails sur l'analyse des données sont fournis dans le document V.

4 Résultats et discussion

4.1 Variation entre les cultivars de pommes inoculés avec des spores de *N. ditissima*

Dans la première étude (Paper I), les dommages causés par les lésions de chancre sur des pousses coupées inoculées avec *N. ditissima* ont été quantifiés en utilisant trois variables différentes : la période d'incubation, le pourcentage d'infection et l'AUDPC. La variation entre les cultivars pour chacune de ces variables a été déterminée à l'aide d'une ANOVA à deux voies (tableau 1 du document I). Une différenciation significative entre les cultivars a été obtenue avec le pourcentage d'infection et l'AUDPC, tandis que la période d'incubation a produit des données moins informatives et n'a pas été utilisée pour d'autres analyses. Lorsque différentes répétitions ont été comparées, les valeurs de l'AUDPC ont produit les données les plus cohérentes (figure 1 et tableau 2 dans le document I) et ont donc été utilisées dans les analyses ultérieures.

Des différences significatives entre les 30 cultivars inoculés ont été constatées au cours des deux années (2012 ; $P < 0,001$, et 2013 ; $P < 0,001$). Le cultivar le plus résistant était 'Prairifire' les deux années, tandis que 'Jonathan' et 'Rödluvan' ont montré la plus grande sensibilité en 2012 et 2013, respectivement (Figure 11). En outre, 'Aroma', 'Golden Delicious', 'Santana' et 'Frösåker' se sont révélés relativement résistants, tandis que 'Elise' et 'Hornö' étaient relativement sensibles les deux années. Une corrélation significative a été trouvée entre les années 2012 et 2013 ($r = 0,57$, $P < 0,001$). Les résultats des cultivars les plus résistants varient moins d'une année à l'autre que les résultats des cultivars les plus sensibles.

Dans la deuxième étude (Paper II), des différences significatives entre les cultivars ont été observées dans les deux séries d'expériences, c'est-à-dire pour les pousses coupées et les arbres en pot d'un an. Il n'y a pas eu d'interaction significative entre le cultivar et l'année, que ce soit pour les pousses coupées ou pour les arbres d'un an. En revanche, une corrélation significative a été trouvée entre les données des deux années pour chaque série d'expériences, ce qui

indique une répétabilité au fil des années.

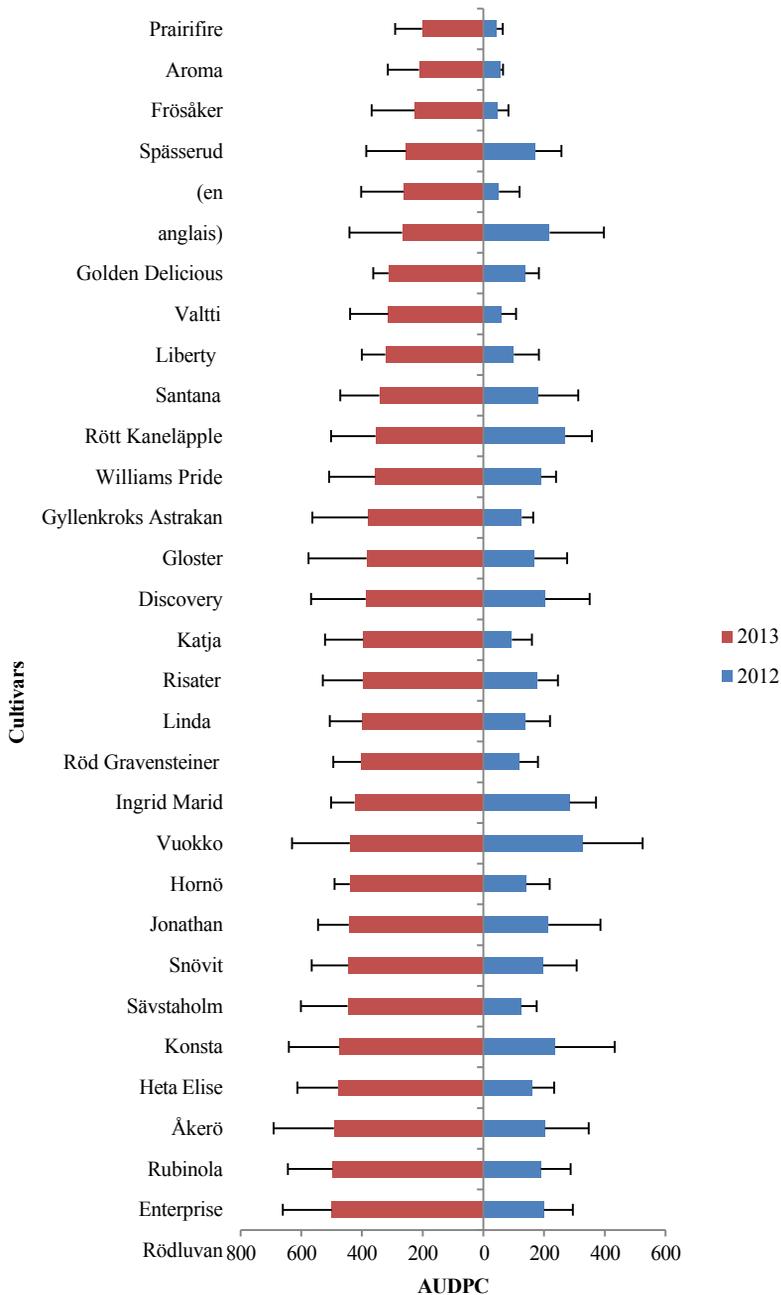


Figure 11. Valeur moyenne de l'AUDPC pour 30 cultivars de pommes inoculés avec *N. ditissima* dans la serre standard en 2012 et 2013.

Dans l'expérience des pousses coupées dans le biotron, 'Cox's Orange Pippin' a été le cultivar le plus sensible les deux années. Les cultivars les plus résistants étaient plutôt 'Santana', 'Golden Delicious' et 'Aroma', et ces cultivars avaient également des valeurs faibles pour le pourcentage d'infection. Dans l'expérience sur les arbres d'un an, 'Golden Delicious' a été le cultivar le plus résistant les deux années, tandis que 'Santana' et 'Aroma' ont été considérés comme résistants en 2012 et 2013, respectivement. 'Charlamovsky' était le cultivar le plus sensible et a également montré la valeur la plus élevée pour le pourcentage d'infection. En outre, 'Gala', 'Cox's Orange Pippin', 'Elise' et 'Prima' se sont révélés relativement sensibles au cours des deux années.

Alors que la méthode des pousses coupées peut produire des estimations approximatives des niveaux de résistance sur une courte période, l'inoculation d'arbres d'un an produit des données avec un pouvoir de résolution supérieur et une répétabilité sur plusieurs années. Cette méthode est cependant plus coûteuse et prend plus de temps, et il est nécessaire de poursuivre le développement des procédures de phénotypage. L'évaluation du pourcentage d'infection dans des conditions "naturelles" (dispersion de spores sur des arbres en pot non blessés) peut constituer un complément précieux aux inoculations par blessure, puisque différentes composantes de la résistance peuvent être ciblées.

Le mécanisme de résistance du pommier contre le chancre des arbres fruitiers n'est pas encore suffisamment connu. Les champignons nécrotrophes comme *N. ditissima* sont généralement classés soit comme des pathogènes spécifiques à l'hôte, soit comme des pathogènes à large gamme d'hôtes (Mengiste, 2012). La capacité des nécrotrophes à large gamme d'hôtes, comme *N. ditissima*, à provoquer des maladies est généralement attribuée à la production d'une diversité de métabolites phytotoxiques, d'enzymes dégradant la paroi cellulaire et d'éliciteurs de mort cellulaire qui tuent les cellules de l'hôte et provoquent la nécrose, alors que les nécrotrophes spécifiques de l'hôte produisent généralement des toxines qui n'ont d'activité que sur un nombre limité d'espèces végétales (Laluk & Mengiste, 2010 ; Friesen *et al.*, 2008). La résistance aux champignons nécrotrophes est quantitative et nécessite généralement de nombreux gènes pour une résistance totale (Laluk & Mengiste, 2010). En revanche, l'agent responsable de la tavelure du pommier, *Venturia inaequalis*, est un champignon hémibiotrophe (Jha *et al.*, 2009), et la résistance qualitative, spécifique à la race, est impliquée dans la réponse de défense du pommier à ce pathogène, y compris la détoxification des toxines fongiques, la régulation transcriptionnelle et la modulation de la réponse de défense (Bastiaanse *et al.*, 2014 ; Poland *et al.*, 2009).

Des études antérieures ont montré qu'il y a une grande variation entre les cultivars de pomme en ce qui concerne le niveau de résistance à *N. ditissima* (Braun, 1997 ; Pedersen *et al.*, 1994), et les différents cultivars de pomme

peuvent probablement utiliser diverses réponses de défense pour supprimer la dissémination et la croissance de ce pathogène. Dans la présente étude, 'Prairifire', qui est un pommier ornemental avec un pedigree comprenant *M. atrosanguinea*, *M. zumi calocarpa*, *M. niedzwetskyana* et *M. moerlandsii* 'Liset', a montré le plus haut niveau de résistance au chancre du pommier, ce qui est probablement dû au fait qu'il n'y a pas de résistance à *N. ditissima* dans la région.

de la résistance à la maladie, qui est liée à son bagage génétique unique. Des gènes de résistance précieux ont ainsi été découverts dans de nombreuses espèces différentes de *Malus*. La résistance à la maladie bactérienne du feu bactérien causée par *Erwinia amylovora* est contrôlée par plusieurs QTL ayant des effets restreints dans les cultivars de pommiers communs (Gardiner *et al.*, 2012 ; Parravicini *et al.*, 2011 ; Civetta *et al.*, 2009 ; Flachowsky *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2006), mais certains gènes majeurs de résistance au feu bactérien ont récemment été découverts dans du matériel provenant d'espèces de pommes sauvages, par exemple *Malus robusta* (Kellerhals *et al.*, 2014 ; Peil *et al.*, 2007). Plusieurs gènes majeurs de résistance à la tavelure ont également été obtenus à partir d'espèces sauvages de *Malus* telles que *M. floribunda* (Würdig *et al.*, 2015 ; Belfanti *et al.*, 2004). Conformément à ces résultats, il pourrait y avoir un ou plusieurs gènes de résistance dans 'Prairiefire' qui pourraient potentiellement jouer un rôle important dans la sélection future contre le chancre des arbres fruitiers.

4.2 PCR quantitative en temps réel pour la détection et la quantification de *N. ditissima* dans les cultivars de pommes sensibles et résistants

La validation d'une paire d'amorces, Bt-fw135/Bt-rw284, a montré qu'un seul amplicon (150 pb), représentant une séquence spécifique et ciblée de l'ADNg de *N. ditissima*, a été obtenu à partir d'isolats de *N. ditissima* (figure 1 du document III). En outre, cette paire d'amorces a amplifié un fragment uniquement dans des échantillons d'ADN de *N. ditissima* et non dans des échantillons d'autres pathogènes fongiques (tableau 1 de l'article III). La spécificité de l'amplification a été confirmée par la détection d'un seul pic spécifique dans l'essai qPCR. L'efficacité d'amplification de cette paire d'amorces a été déterminée à 99,6 % en utilisant la méthode de la courbe standard. Une analyse de la limite de détection (LOD) a montré que la plus petite quantité d'ADNg de *N. ditissima* pouvant être détectée par l'essai qPCR était de 1 pg (figure 12).

Les résultats de l'essai qPCR ont montré que le champignon n'a été détecté dans les tissus échantillonnés que deux mois après l'inoculation, et seulement lorsque les échantillons ont été prélevés au point d'infection. Le champignon n'a été détecté dans la zone entourant le site d'infection dans aucun des six cultivars étudiés.

Des variations dans la capacité à résister ou à supprimer le développement du champignon ont été observées par qPCR dans les six cultivars. Les échantillons du cultivar sensible 'Elise' contenaient la plus grande quantité de biomasse fongique, tandis que les échantillons du cultivar partiellement résistant 'Aroma' en contenaient la plus petite.

Dans notre étude, la disponibilité d'une paire d'amorces spécifiques à l'espèce, Bt-fw135/Bt- rw284, dérivée de la région de la β -tubuline, a permis la détection et la quantification de l'ADNg de *N. ditissima* dans les tissus infectés. De même, les tests qPCR avec des amorces conçues à partir des régions ITS (internal transcribed spacer) se sont avérés efficaces dans l'étude des différences entre les espèces résistantes et sensibles de *N. ditissima*.

de soja en termes d'accumulation de *Phytophthora sojae* (Catal *et al.*, 2013).

Des amorces spécifiques ont été développées précédemment à partir des régions ITS dans le but de détecter *N. ditissima* (Langrell, 2002 ; Langrell & Barbara, 2001), mais ces amorces n'étaient pas adaptées à une utilisation en qPCR en raison de la grande taille du fragment amplifié (412 pb) et des réactions croisées avec l'ADN de pomme.

Afin d'augmenter la sensibilité de notre amorce, d'autres approches telles que la qPCR basée sur TaqMan peuvent être étudiées. Comme cela a été montré précédemment, l'application d'amorces SYBR Green et d'une sonde TaqMan peut augmenter considérablement la sensibilité des amorces (Garces *et al.*, 2014). Il a également été signalé que l'utilisation simultanée de deux sondes TaqMan marquées avec deux colorants rapporteurs différents peut augmenter la sensibilité et la reproductibilité de l'essai dans la plage de détection basse (Yip *et al.*, 2005).

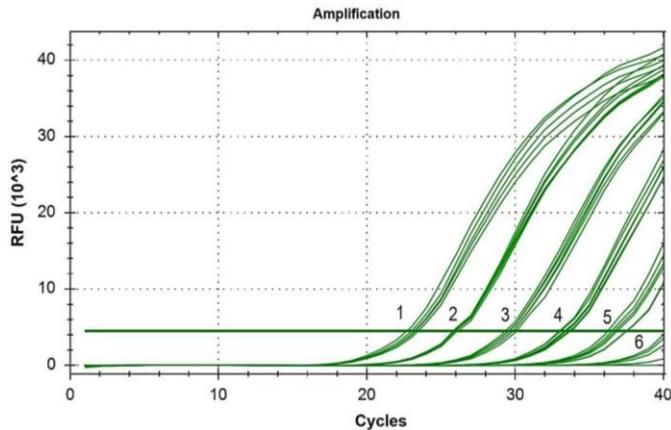


Figure 12. Limite de détection de la qPCR. Signaux 1-6, résultats de la qPCR pour 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg et 0,1 pg d'ADN par réaction, respectivement.

4.3 Histopathologie de l'infection et de la colonisation de cultivars de pommes sensibles et résistants par *N. ditissima*

Pour cette étude, des arbres en pot et des pousses coupées de la plante sensible 'Cox's Orange Pippin' et de la plante partiellement résistante 'Santana' ont été inoculés avec des spores de *N. ditissima*. Les tissus ligneux de la zone affectée ont ensuite été examinés afin d'identifier d'éventuelles différences pouvant être liées au niveau de sensibilité. L'enrobage plastique et les longues périodes d'incubation des spécimens ont permis d'obtenir des sections de bonne qualité à

partir d'échantillons infectés et non infectés.

L'organisation structurelle de l'écorce, du bois et de la moelle était clairement visible sur les coupes transversales de tiges saines colorées au bleu de toluidine (Figure 13) et les hyphes fongiques étaient visualisés par une couleur violet foncé. Dans les arbres d'un an, une masse enchevêtrée d'hyphes fongiques a été observée sous le périderme des deux cultivars à 110 dai, ce qui pourrait être la première étape vers la production de sporodochies (Figure 14A). Ce résultat est en accord avec une étude précédente sur le chancre du tremble causé par *N. ditissima* (Zalasky, 1968). Un plus grand nombre d'hyphes a été observé dans les cellules du parenchyme du cortex du cultivar sensible par rapport au cultivar partiellement résistant, et ces cellules étaient complètement effondrées dans le cultivar sensible (Figure 14B). Le phloème primaire et secondaire (Figure 14C), le xylème primaire et secondaire, les rayons du xylème et les cellules de la moelle ont été affectés dans les tissus infectés des deux cultivars (Figure 4 dans le document III). Ces résultats sont en accord avec des études précédentes sur le chancre du pommier causé par *N. ditissima* (Crowdy, 1949) et l'infection de *Fraxinus* par *N. ditissima* (Sakamoto et al., 2004). Les hyphes pouvaient clairement pénétrer les parois cellulaires secondaires dans les fibres du phloème, les cellules du xylème et les parois lignifiées, comme cela a également été rapporté dans une étude utilisant 'Cox's Orange Pippin' et 'Worcester Pearmain' (Crowdy, 1949). La formation de gel a été observée dans nos deux cultivars, sans différence d'étendue ou de fréquence. En résumé, 'Cox's Orange Pippin' (cultivar sensible) a été plus fortement colonisé par *N. ditissima* que 'Santana', qui est un cultivar partiellement résistant.

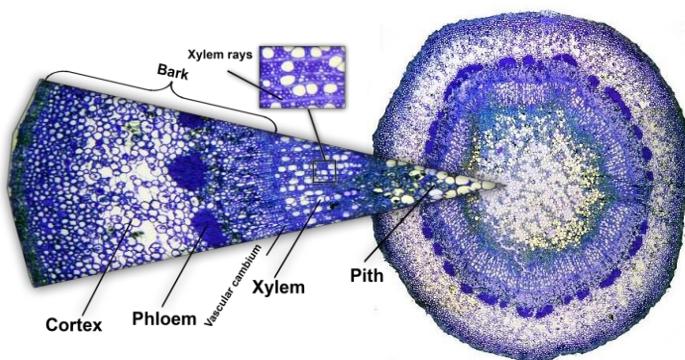


Figure 13. Coupe transversale d'une tige saine avec coloration au bleu de toluidine. Vue d'ensemble de la tige montrant le cortex, le phloème, le xylème, les rayons du xylème et les cellules de la moelle. Le diamètre de la section est de 3,5 mm.

Dans les pousses coupées, des hyphes fongiques ont été observées dans les cellules du cortex, du phloème et du xylème, et les cellules du phloème

s'étaient effondrées chez 'Cox's Orange Pippin' à 18 jours. Les cellules du cortex et du phloème s'étaient déformées et la formation de gel a été observée dans les deux cultivars à

29 jours. Dans le cultivar résistant 'Santana', des hyphes fongiques ont été détectés à 36 jours (Figure 5 dans le document III). Le rythme de développement de l'infection diffère entre les cultivars ; les hyphes fongiques ont été observés plus tôt dans le cultivar sensible que dans le cultivar partiellement résistant. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la nature des mécanismes de défense utilisés contre le pathogène dans le cultivar résistant.

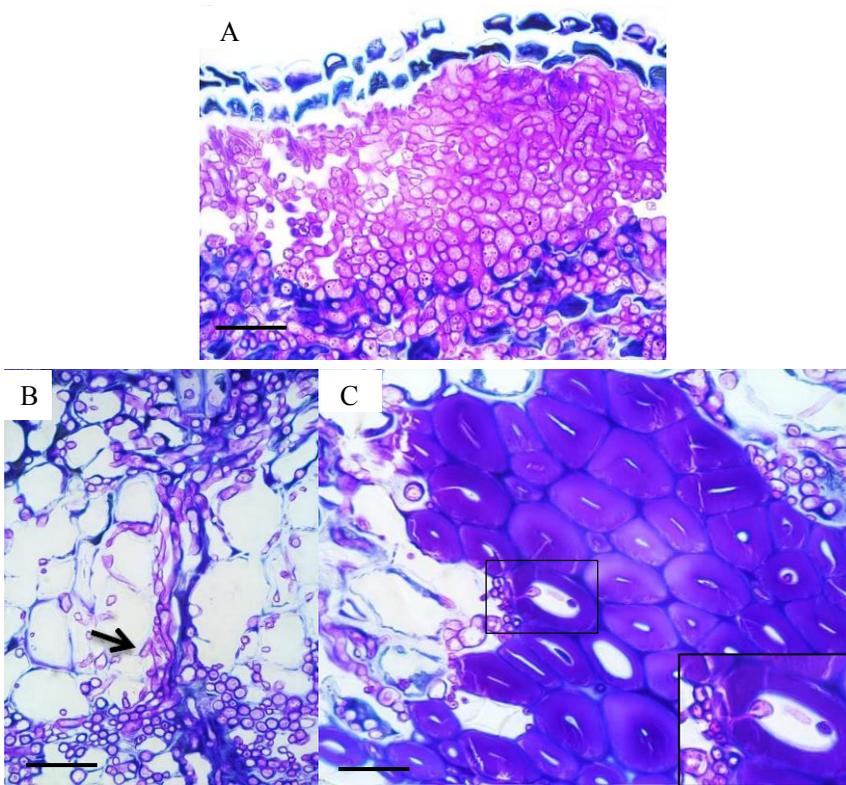


Figure 14. Coupe transversale d'un arbre d'un an 110 jours après l'inoculation dans le cultivar infecté, 'Cox's Orange Pippin'. A : Une agrégation d'hyphes qui montre peut-être un stade précoce de la formation de sporodochies. B : Hyphes fongiques dans les cellules du parenchyme du cortex, qui étaient déformées et effondrées. C : Hyphes fongiques dans le phloème secondaire, ils pénètrent à travers la paroi cellulaire épaisse des cellules fibreuses dans le phloème secondaire. Barre d'échelle : 20 μ m.

La progression de la maladie a été plus lente dans les arbres d'un an que dans les pousses coupées. Les hyphes étaient moins fréquents sur le côté opposé au tissu nécrosé, conformément aux études précédentes (Sakamoto *et al.*, 2004 ; Crowdy, 1949) où l'infection était signalée comme étant

relativement locale. Quelques formations occasionnelles de gel

a été trouvé dans les deux cultivars mais aucun tylose n'a été détecté. En résumé, aucune différence structurelle significative n'a été trouvée entre les cultivars résistants et sensibles, mais la propagation de l'infection a été plus lente dans le cultivar partiellement résistant. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes sur le raisin (Baccari & Lindow, 2011 ; Chatelet *et al.*, 2011) où aucune différence significative n'a été trouvée dans l'anatomie générale de la tige entre les variétés résistantes et sensibles infectées par *Xylella fastidiosa*.

La principale différence entre le cultivar sensible et le cultivar résistant était le degré de colonisation par le pathogène. Il est possible qu'une libération différentielle d'inhibiteurs tels que les phytoalexines, qui sont des antibiotiques naturels pour les plantes, puisse être impliquée dans la limitation de la propagation du pathogène de manière plus efficace dans les cultivars résistants. Des études antérieures ont montré que le degré de résistance de l'hôte et le niveau d'accumulation de phytoalexines sont souvent fortement corrélés (Hall *et al.*, 2011 ; Shi *et al.*, 1991). Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les phytoalexines influencent la réaction de défense contre *Neovectria*, en réduisant éventuellement le taux de colonisation et en perturbant le métabolisme de l'agent pathogène.

4.4 Diversité génétique et relations génétiques chez *N. ditissima*

Les amorces SSR ont produit un niveau plus élevé de polymorphisme de bande parmi les isolats étudiés que les amorces AFLP. Cela est probablement dû à la détection d'allèles multiples à un locus donné par les marqueurs SSR, alors que les marqueurs AFLP détectent principalement des allèles uniques à des loci multiples répartis de manière aléatoire dans le génome. Une analyse de la variation moléculaire (AMOVA) basée sur l'AFLP parmi 44 isolats, obtenus à partir de huit vergers différents, a révélé une différenciation génétique relativement faible entre les vergers (11 % contre 89 % de variation à l'intérieur du verger).

Une analyse des coordonnées principales (PCoA) a été réalisée à partir des données SSR de 28 isolats (figure 1 du document IV). Les isolats étaient faiblement groupés et il n'y avait pas d'association avec l'origine géographique. Des résultats similaires ont été obtenus avec une PCoA utilisant des données AFLP pour les mêmes 28 isolats, et avec une analyse de cluster basée sur l'UPGMA utilisant des données AFLP pour 44 isolats (Figure 2 dans l'article IV). Dans cette dernière analyse, les isolats provenant du même arbre ont été regroupés, tandis que les isolats provenant d'arbres différents dans le même verger ou dans des vergers différents n'ont montré aucun schéma spatial. Le flux génétique entre les populations (vergers) peut empêcher la subdivision géographique (Lenormand, 2002), soit en raison de niveaux relativement élevés

de flux génétique historique ou de niveaux élevés de mutations spontanées et/ou du mouvement de matériel végétal d'une région à l'autre (Carlile *et al.*, 2001).

Pour étudier le système de reproduction de ce pathogène, des isolats d'ascospores uniques provenant du même périthèce ou de différents périthèces sur le même arbre ou sur des arbres différents ont été analysés à l'aide de marqueurs SSR et AFLP. Les résultats de la SSR

suggère que toutes les ascospores d'un même arbre sont identiques. Des variations beaucoup plus importantes ont été détectées avec les marqueurs AFLP, même parmi les isolats du même périthèce (Figure 15). Il est évident que le champignon est hétérothallique, ce qui permet des croisements, mais l'autofécondation ne peut pas être exclue. Des études antérieures basées sur la morphologie des spores de *N. ditissima* ont signalé une reproduction hétérothallique (Krüger, 1974) ainsi qu'homothallique (El-Gholl *et al.*, 1986). L'espèce congénère *N. haematococca* a des populations à la fois homothalliques et hétérothalliques (Coleman, 2008), et cela pourrait être vrai aussi pour *N. ditissima*.

La gestion des pathogènes à reproduction sexuée est plus difficile en raison de l'apparition constante de nouveaux génotypes, qui augmentent la variation des caractéristiques telles qu'une plus grande agressivité, une résistance aux fongicides et une meilleure aptitude dans la population. On peut donc s'attendre à ce que *N. ditissima* soit dotée d'un système d'accouplement par croisement externe

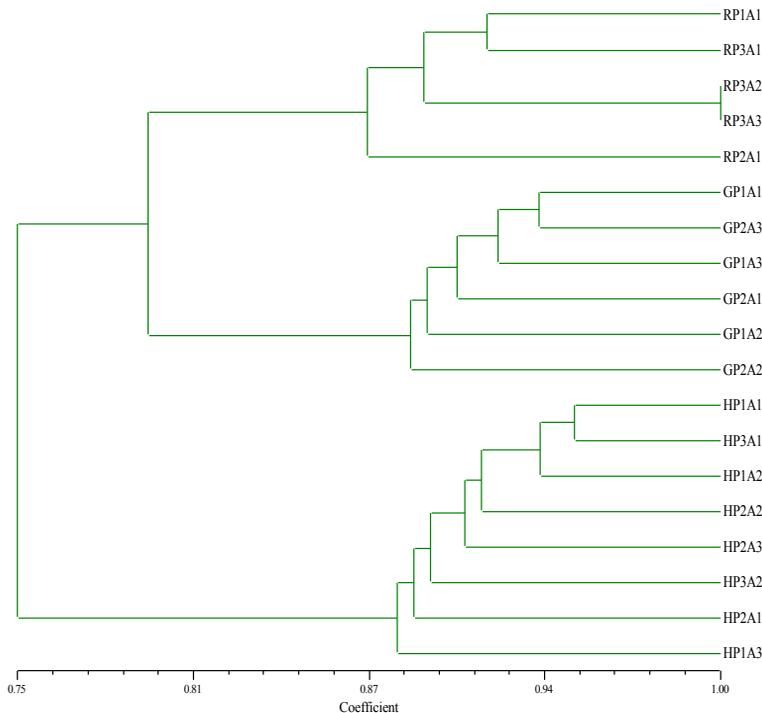


Figure 15. Dendrogramme dérivé des profils de bandes AFLP des isolats à une seule ascospore provenant de différents périthèces de *N. ditissima*. R : Red Delicious, G : Gravensteiner, H : Holsteiner Cox, P1-3 : différents périthèces, A1-3 : différentes ascospores uniques.

pour accélérer l'évolution de l'adaptation aux hôtes résistants et aux fongicides couramment appliqués (McDonald & McDermott, 1993).

Lorsque les deux types de marqueurs ont été comparés à l'aide d'un test de Mantel, les distances génétiques entre les isolats n'ont montré aucune correspondance, probablement en raison du nombre insuffisant de bandes détectées avec les amorces SSR. Les marqueurs AFLP semblent donc avoir un meilleur potentiel pour évaluer la diversité génétique et les relations de ce pathogène.

4.5 Identification des gènes différentiellement exprimés dans les cultivars partiellement résistants et sensibles en réponse à l'inoculation de *N. ditissima*

Afin d'identifier les gènes qui sont exprimés de manière différentielle en réponse à l'attaque du pathogène, un cultivar partiellement résistant ('Jonathan') et un cultivar sensible ('Prima') ont été étudiés, à trois moments différents après l'inoculation d'arbres en pot âgés d'un an avec des spores de *N. ditissima*. Au total, 36 échantillons d'ARN ont été prélevés pour l'analyse RNA-Seq. Environ 392 millions de lectures d'extrémités appariées ont été obtenues. Au total, 345 millions de lectures Illumina ont passé le filtre de qualité. La majorité des lectures ont été mises en correspondance avec la séquence de référence du génome de la pomme (Velasco et al., 2010).

Une analyse en composantes principales (ACP) des comptes normalisés DESeq2 pour 46157 gènes (sur un total de 63541) est présentée dans la figure 16. Le nombre le plus faible de gènes différentiellement exprimés (DEG) a été obtenu à 5 dai, tandis que le nombre le plus élevé a été trouvé à 30 dai (tableau 1 dans le document V).

Un total de 1055 gènes, qui étaient régulés différemment dans le cultivar résistant par rapport au cultivar sensible, ont été sélectionnés pour une analyse plus approfondie. La comparaison de ces DEG avec la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) indique qu'ils sont impliqués dans 72 voies métaboliques (tableau 3 dans le document V).

Une classification fonctionnelle a été réalisée d'abord pour chaque cultivar séparément en utilisant les DEG (Figure 3 dans le document V) et ensuite avec les termes GO de la liste des 1055 gènes (Figure 17). Sur la base de ces résultats, le groupe des fonctions moléculaires a été divisé en 11 sous-catégories, les composants cellulaires en 6 sous-catégories et les processus biologiques en 12 sous-catégories dans les deux analyses.

Plusieurs gènes étaient associés aux processus d'apoptose, tels que *RPMI*, et certains étaient impliqués dans la réponse de défense, par exemple *MLO12* (mildew resistance locus O 12), *Bet v I* (pathogenesis-related proteins), *NPR3* (impliqué dans la réponse à la blessure), *ACT7* (impliqué dans la réponse à la

blessure) et *BAK1* (Leu-rich receptor serine/threonine protein kinase). Tous ces gènes étaient régulés à la hausse dans le cultivar partiellement résistant 'Jonathan'. Le gène *Bet v I* appartient à la famille

10 des protéines liées à la pathogénèse végétale (PR-10). Les protéines liées à la pathogénèse (PR) ont été rapportées comme étant induites dans les plantes en cas d'attaque par un pathogène (Linthorst & Van Loon, 1991 ; Van Loon, 1985).

Plusieurs gènes impliqués dans la voie de transport des électrons étaient également régulés à la hausse dans le cultivar partiellement résistant, par exemple *CYP71A25* (cytochrome P450), *CYP71A26* (codant pour la liaison à l'oxygène) et *ATBCB* (protéine de liaison au cuivre). Les cytochromes P450 (CYP) appartiennent à une superfamille de protéines et sont impliqués dans le catabolisme de métabolites secondaires, par exemple des molécules hormonales et de signalisation, des antioxydants, des substances allélochimiques et des composés de défense (Bak *et al.*, 2011 ; Morant *et al.*, 2003). Dans cette étude, le niveau d'expression de *CYP71A25* et *CYP71A26* a été régulé à la hausse en réponse à l'inoculation de *N. ditissima* sur le cultivar partiellement résistant. Trognitz *et al.* (2002) ont montré que les cytochromes P450 jouent un rôle dans la réponse de défense des plantes.

Certains gènes étaient impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes, par exemple *DMR6* (codant pour l'activité oxydoréductase) et *TT10* (polyphénol oxydases de type laccase). Certains gènes impliqués dans les processus métaboliques, par exemple *ELI3-1* (gène 3-1 activé par l'éliciteur), *GT/UGT74F2* (UDP-glucosyltransférase 74F2), *ATGSTF13* (glutathion transférase) et *CADI* (glutathion gamma-glutamylcystéinyltransférase 1) ont été régulés de manière différentielle entre les cultivars résistants et sensibles (tableau 2 dans le document V). Les gènes *PAL1* et *PAL2*, qui étaient régulés à la hausse dans le cultivar partiellement résistant, participent à la défense des plantes contre les pathogènes et catalysent la première étape de la biosynthèse des phénylpropanoïdes, qui est responsable de la production de lignine (Dixon *et al.*, 2002). Comme une activité accrue du gène PAL a été observée dans les feuilles de pommier infectées par *Venturia inaequalis* (Petkovsek *et al.*, 2011 ; Schovankova & Opatova, 2011), une activité PAL accrue contribuera très probablement à réduire également l'infection par *N. ditissima*.

L'expression de certains gènes tels que *WRKY72*, *WRKY70*, *WRKY40*, *MYB2* et des gènes de facteurs de transcription a été induite en réponse à l'inoculation de *N. ditissima*. Les protéines WRKY constituent une grande famille de facteurs de transcription (Eulgem *et al.*, 2000). Les membres de la famille WRKY semblent être impliqués dans la régulation de différents programmes physiologiques chez les plantes tels que la défense contre les pathogènes (Eulgem & Somssich, 2007). Eulgem *et al.* (2000) ont également rapporté que l'infection par des virus, des bactéries et des champignons augmentait le niveau d'ARNm WRKY.

Les cytochromes P450 (CYP) appartiennent à la plus grande famille de protéines végétales et sont impliqués dans la détoxification et la biosynthèse de

métabolites secondaires (Morant *et al.*, 2003), et peuvent jouer un rôle dans la réponse de défense des plantes (Trognitz *et al.*, 2002). La présente étude a démontré que les niveaux d'expression de *CYP71A25* et *CYP71A26* étaient régulés à la hausse en réponse à l'inoculation de *N. ditissima* dans le cultivar partiellement résistant.

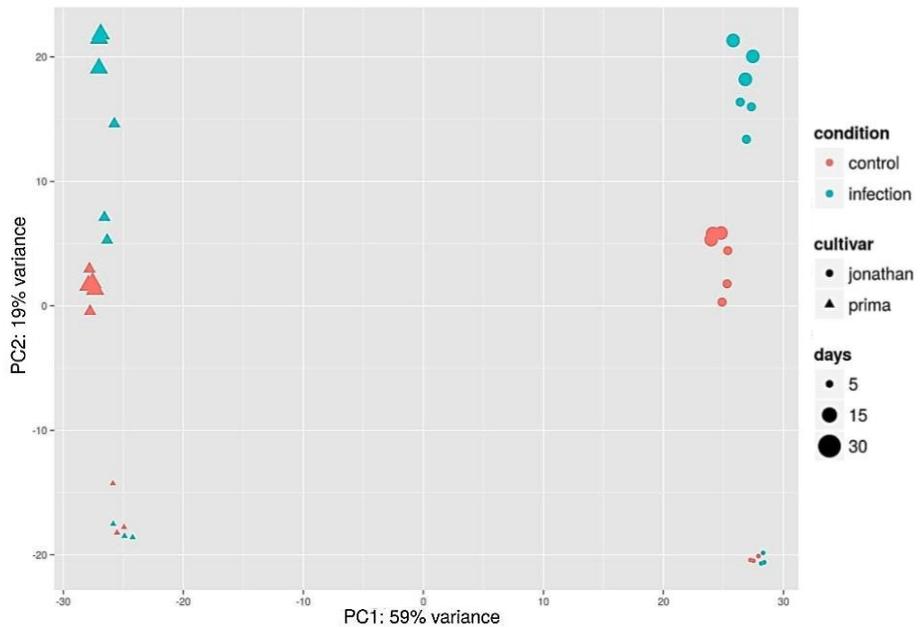


Figure 16. Analyse en composantes principales de 36 échantillons à l'aide du logiciel DESeq2, qui a normalisé les comptes de 46157 gènes (sur un total de 63541).

La réponse des cultivars de pommes inoculés avec *N. ditissima* implique également l'augmentation de la régulation des gènes impliqués dans la fortification des parois cellulaires, la détoxification, la phosphorylation et la défense contre les pathogènes.

Les résultats de cette étude ont révélé les gènes différentiellement exprimés au niveau de la transcription entre un cultivar de pommier sensible et un cultivar de pommier résistant, infectés par *N. ditissima*, en utilisant la technologie RNA-Seq. En outre, elle a fourni une mine d'informations pour des recherches plus approfondies afin de comprendre les mécanismes de pathogénicité de différents cultivars de pommiers contre le chancre de l'arbre fruitier.

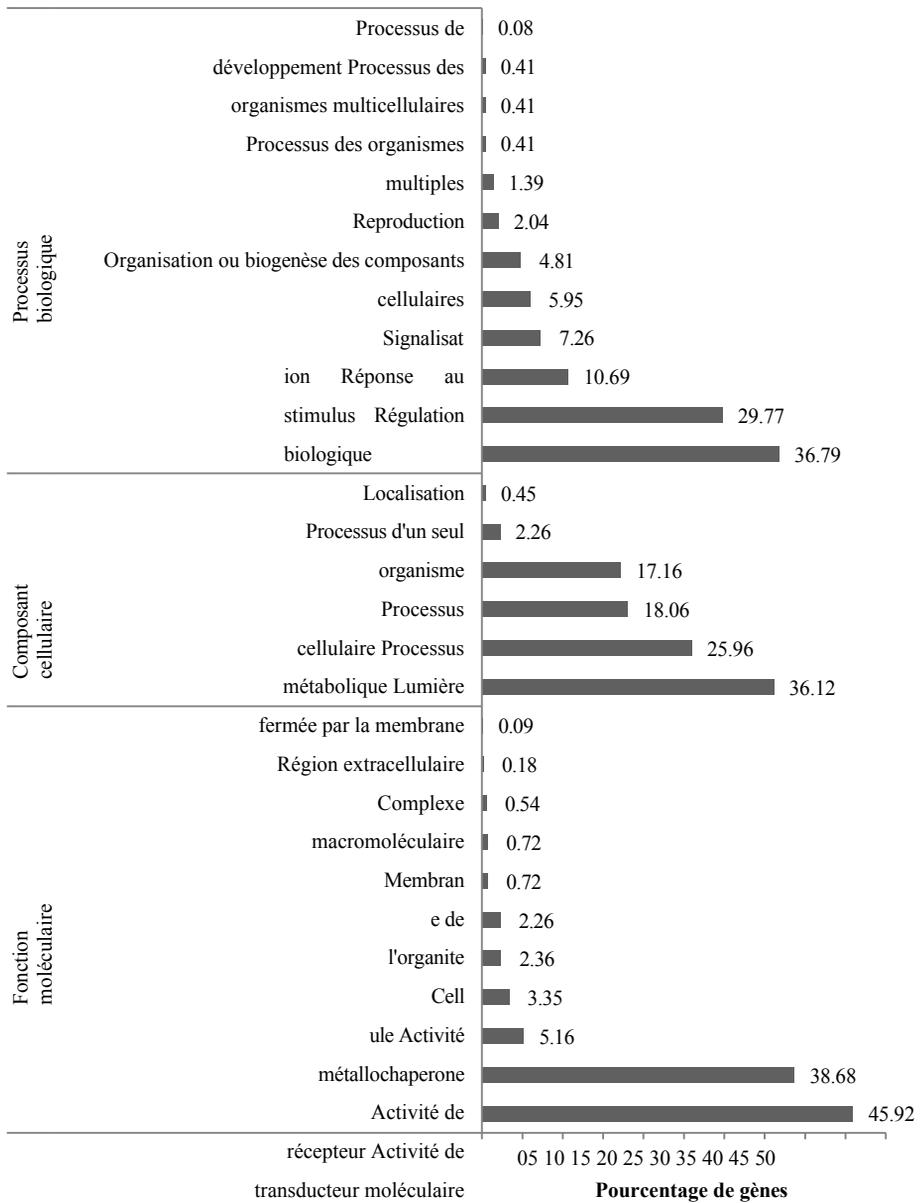


Figure 17. Classification de l'ontologie des gènes avec le niveau de coupure 2 des gènes différentiellement exprimés.

5 Conclusions et perspectives d'avenir

Les études menées dans le cadre de cette thèse peuvent être résumées dans les conclusions suivantes :

- Des variations dans les niveaux de résistance au chancre ont été observées parmi les cultivars de pommes étudiés. Cette variation a été estimée par différents paramètres : l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC), la période d'incubation et le pourcentage d'infection. Deux types de modèles de plantes, la pousse coupée et l'arbre d'un an, ont été utilisés pour vérifier les résultats. Les différences de résistance entre les cultivars constatées dans cette étude peuvent être exploitées dans les programmes de sélection.
- Un test qPCR a été développé avec succès, permettant de détecter et de quantifier *Neonectria ditissima* dans les cultivars de pommes à l'aide d'un test qPCR. paire d'amorces spécifiques à l'espèce. Cependant, ce test n'est pas suffisamment sensible pour détecter le champignon dans les tissus asymptomatiques. Comme il y avait une relation entre la biomasse de *N. ditissima* et la taille des lésions dans différents cultivars, ce test qPCR peut être utile pour étudier les différences entre les cultivars résistants et sensibles.
- Une analyse au microscope optique de deux cultivars de pommes infectés a montré que les hyphes fongiques peuvent pénétrer dans tous les types de cellules, c'est-à-dire dans le cortex, Les cellules du phloème, du xylème et de la moelle, mais l'infection progresse plus rapidement chez les cultivars sensibles, ce qui se traduit par une plus grande quantité d'hyphes fongiques dans un laps de temps donné. Cela indique que le niveau de résistance n'est pas lié à l'anatomie du tissu ligneux du pommier ; au contraire, d'autres mécanismes, par exemple la défense chimique, sont plus susceptibles

d'être impliqués dans la résistance au chancre.

- Le système de reproduction de *N. ditissima* a été étudié par l'application de l'analyse AFLP d'isolats d'ascospores uniques provenant de la même plante. périthécium. Les résultats indiquent que ce champignon est hétérothallique, c'est-à-dire qu'il se croise. Cependant, quelques isolats étaient identiques, ce qui suggère que la reproduction homothallique peut également avoir lieu.
- Ni les marqueurs SSR ni les marqueurs AFLP n'ont permis de détecter un modèle spatial de variation génétique parmi les isolats à ascospores uniques de *N. ditissima*.
La différenciation entre les vergers était également très limitée. Il est possible que des niveaux élevés de flux de gènes dus au transfert de matériel végétal sur de longues distances expliquent la faible différenciation et l'absence de modèle d'isolement par la distance, mais des taux de mutation élevés peuvent également jouer un rôle.
- Une analyse de l'expression des gènes à l'aide de données RNA-Seq suggère que de nombreux gènes impliqués dans la détoxification, la lignification, la phosphorylation et l'oxydation de l'eau de mer sont également impliqués dans le processus d'oxydation.
Les gènes de défense contre les pathogènes sont exprimés de manière différentielle dans les cultivars de pommes résistants et sensibles. Certains gènes ayant une fonction liée à la défense, *Bet v I*, *MLO12*, *ACT7*, *NPR3* et *BAK1*, ont été induits dans le cultivar de pomme partiellement résistant pendant l'infection.
- Les changements observés dans l'expression des gènes entre les cultivars sensibles et résistants mettent en évidence les gènes candidats possibles qui peuvent jouer un rôle dans l'expression des gènes.
dans les mécanismes de résistance partielle du pommier et d'améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la lutte contre le chancre des arbres fruitiers.

Références

- Agrios, G.N. (1997). *Plant pathology*. 5. ed. Londres : Academic press.
- Ainsworth, G.C. & Bisby, G.R. (2011). *Dictionnaire des champignons*. 10e. éd. Wallingford, Oxon, UK : CAB International.
- Anders, S. et Huber, W. (2010). Analyse d'expression différentielle pour les données de comptage de séquences. *Genome Biology*, 11(10), R106.
- Anders, S., Pyl, P.T. et Huber, W. (2014). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data (cadre Python pour travailler avec des données de séquençage à haut débit). *Bioinformatics*, doi:10.1093/bioinformatics/btu638.
- Andrews, S. (2010). FastQC : Un outil de contrôle de qualité pour les données de séquence à haut débit. <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Baccari, C. & Lindow, S.E. (2011). Évaluation du processus de déplacement de *Xylella fastidiosa* au sein de cultivars de raisin sensibles et résistants. *Phytopathology*, 101(1), pp. 77-84.
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S. et Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 9, pp. 1-56.
- Baker, K. & Cook, R.J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. p. 433.
- Bakhru, H. (1995). *Foods that heal, The natural way to good health*. Orient Livres de poche. ND. Inde.
- Balconi, C., Stevanato, P., Motto, M. et Biancardi, E. (2012). Sélection pour la résistance/tolérance au stress biotique chez les plantes. *Crop Production for Agricultural Improvement* : Springer, pp. 57-114.
- Bastiaanse, H., Muhovski, Y., Parisi, O., Paris, R., Mingeot, D. & Lateur, M. (2014). Gene expression profiling by cDNA-AFLP reveals potential candidate genes for partial resistance of 'President Roulin' against *Venturia inaequalis*. *BMC genomics*, 15(1), p. 1043.
- Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., Vinatzer, B.A., Gianfranceschi, L., Gessler, C. & Sansavini, S.

- (2004). Le gène *HcrVf2* d'une pomme sauvage confère une résistance à la tavelure à une variété cultivée transgénique. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), pp. 886-890.
- Beltra, R., Ballesteros & Liahoz, R. (1969). Etudes sur la production de substances de croissance par *Nectria galligena*. *Microbiologia Espanola*, 22(1), pp. 41-54.
- Bénaouf, G. & Parisi, L. (2000). Génétique des relations hôte-pathogène entre *Venturia inaequalis* races 6 et 7 et les espèces de *Malus*. *Phytopathology*, 90(3), pp. 236-242.
- Beresford, R.M. & Kim, K.S. (2011). Identification des conditions climatiques régionales favorables au développement du chancre européen du pommier. *Phytopathology*, 101(1), pp. 135-146.
- Bolger, A. et Giorgi, F. (2014). Trimmomatic : A Flexible Read Trimming Tool for Illumina NGS Data. <http://www.usadellab.org/cms/index.php>.
- Botton, A., Lezzer, P., Dorigoni, A., Barcaccia, G., Ruperti, B. & Ramina, A. (2008). Genetic and environmental factors affecting allergen-related gene expression in apple fruit (*Malus domestica* L. Borkh). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), pp. 6707-6716.
- Brandt, R.W. (1964). *Nectria canker of hardwoods*. USDA Forest Service.
- Braun, G. et Craig, B. (2008). Organic apple production guide for atlantic Canada. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*.
- Braun, P. (1997). Distribution et gravité du chancre anthracnose et du chancre européen du pommier dans le comté de Kings, Nouvelle-Écosse. *Revue canadienne de pathologie végétale*, 19(1), pp. 78-82.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C. & Gooday, G.W. (2001). *The fungi*. Gulf Professional Publishing.
- Castlebury, L.A., Rossman, A.Y. & Hyten, A.S. (2006). Relations phylogénétiques de *Neonectria/Cylindrocarpon* sur *Fagus* en Amérique du Nord. *Revue canadienne de botanique*, 84(9), pp. 1417-1433.
- Catal, M., Erler, F., Fulbright, D.W. & Adams, G.C. (2013). Real-time quantitative PCR assays for evaluation of soybean varieties for resistance to the stem and root rot pathogen *Phytophthora sojae*. *European Journal of Plant Pathology*, 137(4), pp. 859-869.
- Cayley, D.M. (1921). Some Observations on the life-history of *Nectria galligena* Bres. *Annals of Botany*, 35(137), pp. 79-92
- Chatelet, D.S., Wistrom, C.M., Purcell, A.H., Rost, T.L. & Matthews, M.A. (2011). Xylem structure of four grape varieties and 12 alternative hosts to the xylem-limited bacterium *Xylella fastidiosa* (Structure du xylème de quatre variétés de raisin et de 12 hôtes alternatifs de la bactérie *Xylella fastidiosa*). *Annales de botanique*, 108(1), pp. 73-85.

- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A.Y. & Samuels, G.J. (2011). Délimitation de *Neonectria* et *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) et des genres apparentés avec des anamorphes semblables à *Cylindrocarpon*. *Studies in Mycology* (68), pp. 57-78.
- Civetta, A., Durel, C.-E., Denancé, C. & Brisset, M.-N. (2009). Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821. *Genome*, 52(2), pp. 139-147.
- Clatterbuck, W.K. (2006). *Tree Wounds : Réponse des arbres et ce que vous pouvez faire*. Agricultural Extension Service : Université du Tennessee, UT Extension.
- Coleman, J.J. (2008). *ABC transporters as virulence factors in Nectria haematococca MPVI and genomic analysis of the fungus suggest involvement of horizontal gene transfer in its evolution*. ProQuest.
- Coleman, J.J., Rounsley, S.D., Rodriguez-Carres, M., Kuo, A., Wasmann, C. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Taga, M., White, G.J. & Zhou, S. (2009). Le génome de *Nectria haematococca* : contribution des chromosomes surnuméraires à l'expansion des gènes. *PLoS genetics*, 5(8), p. e1000618.
- Cooke, L.R. (1999). L'influence des pulvérisations de fongicides sur l'infection du plant de pommier cv. Bramley's seedling par *Nectria galligena*. *European Journal of Plant Pathology*, 105(8), pp. 783-790.
- Cooke, L.R., Watters, B.S. & Brown, A.E. (1993). L'effet des pulvérisations de fongicides sur l'incidence du chancre du pommier (*Nectria galligena*) dans les semis de bramley. *Plant Pathology*, 42(3), pp. 432-442.
- Crowdy, S.H. (1949). Observations sur le chancre du pommier .3. L'anatomie du chancre de la tige. *Annales de biologie appliquée*, 36(4), pp. 483-495.
- Crowdy, S.H. (1952). Observations sur le chancre du pommier .4. L'infection des cicatrices foliaires. *Annals of Applied Biology*, 39(4), pp. 569-580.
- Dewey, F.M. & Swinburne, T.R. (1995). Un essai immunologique d'anticorps monoclonal pour la détection de *Nectria galligena* dans les fruits et les tissus ligneux des pommiers. *Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes*, 25(1-2), pp. 65-73.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M. & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), pp. 371-390.
- Dubin, H. et English, H. (1970). Facteurs affectant l'infection de la cicatrice foliaire du pommier par

Conidies de *Nectria galligena*. *Phytopathology*, 64, pp. 1201-1203.
El-Gholl, N., Barnard, E. & Schroeder, R. (1986). Homothallisme chez *Nectria galligena*. *Journal canadien de botanique*, 64(4), pp. 902-903.

- English, H., Dubin, H.J. & Schick, F.J. (1979). Lutte chimique contre le chancre européen du pommier. *Plant Disease Reporter*, 63(12), pp. 998-1002.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S. & Somssich, I.E. (2000). La superfamille WRKY des facteurs de transcription des plantes. *Trends in Plant Science*, 5(5), pp. 199-206.
- Eulgem, T. & Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling (Réseaux de facteurs de transcription WRKY dans la signalisation de défense). *Current opinion in plant biology*, 10(4), pp. 366- 371.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0) : un logiciel intégré pour l'analyse des données de génétique des populations. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, p. 47.
- FAO (2013). Division des statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P. & Rossman, A.Y. (1989). *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS press.
- Flachowsky, H., Richter, K., Garcia-Libreros, T., Celton, J.-M., Gardiner, S., Horner, M., Peil, A., Hanke, M.-V. & Bus, V. (2007). Confirmation du QTL Fire Blight de *Malus × robusta* 5 sur le groupe de liaison 3. *Actes du XIe atelier international sur le feu bactérien 793*, pp. 297-303.
- Flack, N. & Swinburne, T. (1977). Gamme d'hôtes de *Nectria galligena* Bres. et pathogénicité de certains isolats d'Irlande du Nord. *Transactions of the British Mycological Society*, 68(2), pp. 185-192.
- Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S. & Oliver, R.P. (2008). Host-specific toxins : effectors of necrotrophic pathogenicity (toxines spécifiques de l'hôte : effecteurs de la pathogénicité nécotrophe). *Cellular microbiology*, 10(7), pp. 1421-1428.
- Garces, F.F., Gutierrez, A. & Hoy, J.W. (2014). Détection et quantification de *Xanthomonas albilineans* par qPCR et caractérisation potentielle de la résistance de la canne à sucre à l'échaudure des feuilles. *Plant Disease*, 98(1), pp. 121-126.
- Gardiner, S.E., Norelli, J.L., de Silva, N., Fazio, G., Peil, A., Malnoy, M., Horner, M., Bowatte, D., Carlisle, C. & Wiedow, C. (2012). Putative resistance gene markers associated with quantitative trait loci for fire blight resistance in *Malus* 'Robusta 5' accessions. *BMC genetics*, 13(1), p. 25.
- Garkava-Gustavsson, L., Zborowska, A., Sehic, J., Rur, M., Nybom, H., Englund, J.E., Lateur, M., Van de Weg, E. & Holefors, A. (2013). Screening of apple cultivars for resistance to european canker, *Neonectria ditissima*. *Acta Horticulturae*, 976, pp. 529-536.

- Gelvonauskienė, D., Sasnauskas, A. & Gelvonauskis, B. (2007). Sélection de pommiers résistants au chancre européen (*Nectria galligena* Bres.). *Sodininkyste ir Darzininkyste*, 26(3), pp. 174-178.
- Ghasemkhani, M. (2012). *Base génétique de la résistance au chancre de l'arbre fruitier chez le pommier*. Document d'introduction à la Faculté de l'aménagement du paysage, de l'horticulture et des sciences agricoles : Université suédoise des sciences agricoles.
- Ghasemkhani, M., Liljeroth, E., Sehic, J., Zborowska, A. & Nybom, H. (2015). Méthode des pousses de coupure pour l'estimation de la résistance partielle des cultivars de pommiers au chancre de l'arbre fruitier causé par *Neonectria ditissima*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 65(5), pp. 412-421.
- Goethe, R. (1880). Weitere Mitteilungen über den Krebs der Apfelbäume. *Landwirtschaftliche Jahresbericht*, 2, pp. 837-852.
- Gomori, G. (1955). Préparation de tampons pour l'étude des enzymes. *Methods in Enzymology*, 1, pp. 138-146.
- Grove, G.G. (1990). Nectria canker, in compendium of apple and pear diseases. (eds, Jones, A. L. et Aldwinckle, H. S.) *American Phytopathological Society Press, St-Paul*. Minnesota, USA, pp. 35-36.
- Hall, C., Heath, R. et Guest, D.I. (2011). Accumulation rapide et intense de phytoalexines terpénoïdes dans les tissus infectés du xylème du coton (*Gossypium hirsutum*) résistant à *Fusarium oxysporum* f.sp *vasinfectum*. *Physiological and molecular plant pathology*, 76(3-4), pp. 182-188.
- Hancock, J.F. (2008). *Sélection des cultures fruitières tempérées : du germoplasme à la génomique*. Springer Science & Business Media.
- Hanlin, R.T. (1971). Morphologie de *Nectria haematococca*. *American Journal of Botany*, 58(1), pp. 105-116.
- Harris, S.A., Robinson, J.P. & Juniper, B.E. (2002). Genetic clues to the origin of the apple. *TRENDS in Genetics*, 18(8), pp. 426-430.
- Hartig, R. (1880). De Krebspilz der Laubholz Bäume. *Untersuchungen aus dem Forstbotanisches. Institut zu München*, I, pp. 109-128.
- Jha, G., Thakur, K. et Thakur, P. (2009). The *Venturia* apple pathosystem : pathogenicity mechanisms and plant defense responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2009/680160.
- Johnson, R. (1992). Possibilités passées, présentes et futures en matière de sélection pour la résistance aux maladies, avec des exemples tirés du blé. *Euphytica*, 63(1-2), pp. 3-22.
- Juniper, B., Watkins, R. & Harris, S. L'origine de la pomme. (1996). *Proceedings of Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 484*, pp. 27-34.

- Kellerhals, M., Schuetz, S., Baumgartner, I.O., Schaad, J., Kost, T., Brogгинi, G. & Patocchi, A. (2014). Sélection de variétés de pommes résistantes au feu bactérien. *Agrarforschung Schweiz*, 5(10), pp. 414-421.
- Kennel, W. (1963). Zur Pathogenese des Obstbaumkrebses (*Nectria galligena* Bres.) am Apfel. *Gartenbauwissenschaft*, pp. 29-64.
- Khachatourians, G.G. (2002). *Plantes et cultures transgéniques*. New York : Marcel Dekker.
- Khan, M.A., Duffy, B., Gessler, C. & Patocchi, A. (2006). QTL mapping of fire blight resistance in apple (cartographie QTL de la résistance au feu bactérien chez le pommier). *Molecular Breeding*, 17(4), pp. 299-306.
- Kozlovskaya, A.Z., Kurdyuk, T.P. & Marudo, G.M. (1999). Sélection pour la résistance aux maladies fongiques chez le pommier. *Acta Horticulturae*, 484, pp. 513-517.
- Krüger, J. (1974). Zur Genetik von *Nectria galligena* Bres. *Journal of Phytopathology*, 79(4), pp. 320-342.
- Laluk, K. & Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants : wanton destruction or covert extortion ? *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- Langrell, S.R.H. (2000). *Phylogénie moléculaire, détection et épidémiologie de Nectria galligena. Bres. l'agent du chancre de Nectria sur pommier*. Diss. Thèse de doctorat : Université de Londres.
- Langrell, S.R.H. (2002). Détection moléculaire de *Neonectria galligena* (syn. *Nectria galligena*). *Mycological Research*, 106, pp. 280-292.
- Langrell, S.R.H. & Barbara, D.J. (2001). Magnetic capture hybridation for improved PCR detection of *Nectria galligena* from lignified apple extracts. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(1), pp. 5-11.
- Lateur, M. & Populer, C. (1994). Screening fruit tree genetic resources in belgium for disease resistance and other desirable characters. *Euphytica*, 77(1-2), pp. 147-153.
- Latorre, B.A., Rioja, M.E., Lillo, C. & Munoz, M. (2002). L'effet de la température et de la durée de l'humidité sur l'infection et un système d'alerte pour le chancre européen (*Nectria galligena*) du pommier au Chili. *Crop Protection*, 21(4), pp. 285-291.
- Lenormand, T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection (flux de gènes et limites de la sélection naturelle). *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), pp. 183-189.
- Linthorst, H.J. & Van Loon, L. (1991). Protéines végétales liées à la pathogenèse. *Critical reviews in plant sciences*, 10(2), pp. 123-150.
- Lortie, M. (1964). Production de périthèces de *Nectria galligena* Bres. en culture pure. *Revue canadienne de botanique*, 42(1), pp. 123-124.

- Lortie, M. & Kuntz, J.E. (1963). Ascospore discharge and conidium release by *Nectria galligena* Bres. under field and laboratory conditions. *Journal canadien de botanique*, 41(8), pp. 1203-1210.
- Love, M., Anders, S. et Huber, W. (2013). Differential analysis of count data- the DESeq2 package. pp. 1-48.
- Luby, J.J., Ferree, D. & Warrington, I. (2003). Classification taxonomique et bref historique. *Apples : botany, production and uses*, pp. 1-14.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27, pp. 209-220.
- Marra, R.E. & Corwin, J.A. (2009). Isolation and characterization of codominant markers for the perennial canker fungal pathogen *Neonectria ditissima*. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), pp. 906-909.
- McCracken, A.R., Berrie, A., Barbara, D.J., Locke, T., Cooke, L.R., Phelps, K., Swinburne, T.R., Brown, A.E., Ellerker, B. & Langrell, S.R.H. (2003). Importance relative des infections en pépinière et de l'inoculum en verger dans le développement et la propagation du chancre du pommier (*Nectria galligena*) dans les jeunes vergers. *Plant Pathology*, 52(5), pp. 553-566.
- McDonald, B.A. & McDermott, J.M. (1993). Population Genetics of Plant Pathogenic Fungi. *Bioscience*, 43(5), pp. 311-319.
- Mengiste, T. (2012). Immunité des plantes contre les nécrotrophes. *Revue annuelle de phytopathologie*, 50, pp. 267-294.
- Mols, P.J.M. & Boers, J.M. (2001). Comparison of a Canadian and a Dutch strain of the parasitoid *Aphelinus mali* (Hald) (Hym., Aphelinidae) for control of woolly apple aphid *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) (Hom., Aphididae) in the Netherlands : a simulation approach. *Journal of Applied Entomology*, 125(5), pp. 255-262.
- Morant, M., Bak, S., Møller, B.L. & Werck-Reichhart, D. (2003). Plant cytochromes P450 : tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation (cytochromes P450 des plantes : outils pour la pharmacologie, la protection des plantes et la phytoremédiation). *Current opinion in biotechnology*, 14(2), pp. 151- 162.
- Munson, R. (1939). Observations on apple canker *Annals of Applied Biology*, 26(3), pp. 440-457.
- O'Rourke, D. (2003). *Production mondiale, commerce, consommation et perspectives économiques des pommes*. Apples : botany, production and uses : CABI Publishing, 02138, USA.
- Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J. & Krüger, J. (1993). Une nouvelle race de *Venturia inaequalis* virulente pour le pommier avec une résistance due au gène *Vf*. *Phytopathology*, 83(5), pp. 533-537.

- Parravicini, G., Gessler, C., Denance, C., Lasserre-Zuber, P., Vergne, E., Brisset, M.N., Patocchi, A., Durel, C.E. & Brogini, G.A. (2011). Identification des gènes de la sérine/thréonine kinase et du site de liaison des nucléotides - répétitions riches en leucine (NBS-LRR) dans le locus de trait quantitatif de la résistance au feu bactérien du cultivar de pomme 'Evereste'. *Molecular Plant Pathology*, 12(5), pp. 493-505.
- Pedersen, H., Christensen, J.V. & Hansen, P. (1994). Susceptibilité de 15 cultivars de pomme à la tavelure, à l'oïdium, au chancre et aux acariens. *Fruit Varieties Journal*, 48(2), pp. 97-100.
- Peil, A., Garcia-Libreros, T., Richter, K., Trognitz, F., Trognitz, B., Hanke, M.V. & Flachowsky, H. (2007). Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breeding*, 126(5), pp. 470-475.
- Petkovsek, M.M., Slatnar, A., Stampar, F. et Veberic, R. (2011). Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biologia Plantarum*, 55(4), pp. 725-730.
- Pijut, P.M. (2006). *Plantation et entretien des semis de feuillus fins : Diseases in hardwood tree plantings*. USDA Forest Service, Northern Research Station : FNR-221. Centre d'amélioration et de régénération des arbres feuillus.
- Plante, F., Hamelin, R.C. et Bernier, L. (2002). Étude comparative de la diversité génétique des populations de *Nectria galligena* et *N. coccinea* var. *faginata* en Amérique du Nord. *Mycological Research*, 106, pp. 183-193.
- Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wisser, R.J., Pratt, R.C. et Nelson, R.J. (2009). Shades of gray : the world of quantitative disease resistance (Nuances de gris : le monde de la résistance quantitative aux maladies). *Trends in Plant Science*, 14(1), pp. 21-29.
- R Development Core Team (2013). *R : A language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing. Vienne, Autriche. <http://www.R-project.org/>.
- Roelfs, A. (1988). Contrôle génétique des phénotypes de la rouille de la tige du blé. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), pp. 351-367.
- Rossmann, A.Y. & Palm-Hernandez, M.E. (2008). Systématique des champignons phytopathogènes : Why it matters. *Plant Disease*, 92(10), pp. 1376- 1386.
- Rossmann, A.Y., Samuels, G.J., Rogerson, C.T. & Lowen, R. (1999). Genera of *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology* (42), pp. 1-248.
- Sakamoto, Y., Yamada, Y., Sano, Y., Tamai, Y. & Funada, R. (2004). Anatomie pathologique du chancre de *Nectria* sur *Fraxinus mandshurica* var. *japonica*. *Iawa Journal*, 25(2), pp. 165-174.

- Sasnauskas, A., Gelvonauskiene, D., Gelvonauskis, B., Bendokas, V. & Baniulis, D. (2006). Résistance aux maladies fongiques des cultivars et hybrides de pommes en Lituanie. *Agronomy Research*, 4, pp. 349-352.
- Saure, M. (1961). *Recherches sur les conditions d'une attaque épidémique de l'Obstbaumkrebses (Nectria galligena Bres.)*. Diss : Obstbauversuchsanstalt.
- Schovankova, J. et Opatova, H. (2011). Changes in phenols composition and activity of phenylalanine-ammonia lyase in apples after fungal infections. *Horticultural Science*, 38(1), pp. 1-10.
- Shaner, G. & Finney, R.E. (1977). Effet de la fertilisation azotée sur l'expression de la résistance au mildiou lent chez le blé Knox. *Phytopathology*, 67(8), pp. 1051-1056.
- Shi, J., Mueller, W. & Beckman, C. (1991). Ultrastructural responses of vessel contact cells in cotton plants resistant or susceptible to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Physiological and molecular plant pathology*, 38(3), pp. 211-222.
- Swinburne, T. (1971). L'infection des pommes, cv. Bramley's Seedling, par *Nectria galligena* Bres. *Annals of Applied Biology*, 68(3), pp. 253-262.
- Swinburne, T., Cartwright, J., Flack, N. & Brown, A.E. (1975). Lutte contre le chancre du pommier (*Nectria galligena*) dans un jeune verger avec des plantes établies.
infections. *Annales de biologie appliquée*, 81(1), pp. 61-73.
- Talukder, Z.I., Tharreau, D. & Price, A.H. (2004). Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. *New Phytologist*, 162(1), pp. 197-209.
- Trapnell, C., Pachter, L. et Salzberg, S.L. (2009). TopHat : discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25(9), pp. 1105-1111.
- Trognitz, F., Manosalva, P., Gysin, R., Niño-Liu, D., Simon, R., del Rosario Herrera, M., Trognitz, B., Ghislain, M. & Nelson, R. (2002). Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* × dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(6), pp. 587-597.
- Van de Weg, E. & Jansen, R. (1989). Sélection pour la résistance à *Nectria galligena* ; différences de résistance entre les populations de plantules. Lutte intégrée contre les maladies des fruits à pépins. *IOBC Bull*, 12(6), pp. 137- 145.
- Van de Weg, W.E. (1987). Note sur une méthode d'inoculation pour infecter les jeunes plants de pommier avec *Nectria galligena* Bres. *Euphytica*, 36(3), pp. 853-854.

- Van de Weg, W.E. (1989). Screening pour la résistance à *Nectria galligena* Bres dans des pousses coupées de pommier *Euphytica*, 42(3), pp. 233-240.
- Van Loon, L. (1985). Protéines liées à la pathogénèse. *Plant Molecular Biology*, 4(2), pp. 111-116.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoy, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchietti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagne, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouze, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.-E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F. & Viola, R. (2010). Le génome de la pomme domestique (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42(10), pp. 833-839.
- Ventura, J., Costa, H., Tatagiba, J. et Naqvi, S. (2004). *Maladies des fruits et légumes : diagnostic et gestion*. Kluwer, Londres.
- Weber, R.W.S. (2014). Biologie et lutte contre le champignon du chancre du pommier *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) dans une perspective nord-ouest européenne. *Erwerbs-Obstbau*, 56(3), pp. 95-107.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. et Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants : principles, methods, and applications*. CRC press.
- Welch, D. (1934). The range and importance of *Nectria* canker on hardwoods in the northeast. *Journal of Forestry*, 32(9), pp. 997-1002.
- Wessel, H. (1979). Sporenfreisetzung bei *Nectria galligena* Bres. in Erwerbs-Apfelanlagen des Niederelbischen Obstbaugesbietes. *Erwerbsobstbau*, 21, pp. 196-201.
- Wiltshire, S.P. (1921). Etudes sur le champignon du chancre du pommier. I. Leaf scar infection. *Annales de biologie appliquée*, 8(3-4), pp. 182-192.
- Würdig, J., Flachowsky, H., Saß, A., Peil, A. & Hanke, M.-V. (2015).

Amélioration de la résistance de différents cultivars de pommes à l'aide du gène *Rvi6* de la tavelure.

- gène de résistance dans une approche cisgénique basée sur le système de recombinaison *Flp/FRT*. *Molecular Breeding*, 35(3), pp. 1-18.
- Xu, X.M. & Butt, D.J. (1994). Biologie et épidémiologie de *Nectria galligena* et système d'alerte en cas d'infection. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 17, pp. 317-324.
- Xu, X.M., Butt, D.J. & Ridout, M.S. (1998). Les effets de la dose d'inoculum, de la durée de la période humide, de la température et de l'âge de la plaie sur l'infection par *Nectria galligena* des plaies de taille du pommier. *European Journal of Plant Pathology*, 104(5), pp. 511-519.
- Xu, X.M. & Robinson, J.D. (2010). Effets de la maturité des fruits et de l'humidité sur l'infection des pommes par *Neonectria galligena*. *Plant Pathology*, 59(3), pp. 542-547.
- Yang, Y., Shah, J. & Klessig, D.F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development*, 11(13), pp. 1621-1639.
- Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T.B., Ye, Z. et Mao, J.X. (1997). POPGENE, le Un logiciel de partage convivial pour l'analyse génétique des populations. *Centre de biologie moléculaire et de biotechnologie, Université de l'Alberta, Canada*, 10.
- Yip, S.P., To, S.S.T., Leung, P.H.M., Cheung, T.S., Cheng, P.K.C. & Lim, W.W.L. (2005). Use of dual TaqMan probes to increase the sensitivity of 1-step quantitative reverse transcription-PCR : application to the detection of SARS coronavirus. *Clinical Chemistry*, 51(10), pp. 1885-1888.
- Zalasky, H. (1968). Pénétration et établissement initial de *Nectria galligena* dans le tremble et le saule à feuilles de pêcheur. *Journal canadien de botanique*, 46(1), pp. 57-60.
- Zeller, S.M. (1926). European canker of pomaceous fruit trees. *Oregon Agricultural College Experiment Station Experiment Station*, pp. 1-50.

Remerciements

Je suis tellement reconnaissante à Dieu de m'avoir donné la force de continuer et de terminer cette expérience extrêmement difficile. Ce fut un voyage passionnant, plusieurs choses se sont produites, bonnes, mauvaises et parfois vraiment mauvaises ! Maintenant, il est temps de remercier toutes les personnes qui ont participé à mes études de doctorat.

Je tiens à remercier tout particulièrement les personnes ci-dessous qui ont contribué à la réussite de mes recherches et m'ont aidé à tout m o m e n t à atteindre mon objectif :

Mon superviseur, le professeur *Hilde Nybom*, mérite d'être profondément remercié pour son soutien vital, qu'il s'agisse d'une rédaction étonnante ou de conseils inestimables. Ses encouragements m'ont permis d'atteindre mon objectif.

Mes superviseurs adjoints : Dr. *Larisa Gustavsson* pour m'avoir fait découvrir le chancre du pommier et m'avoir donné l'opportunité de participer à cette étude. Dr. *Salla Marttila* pour ses discussions fructueuses et son aide précieuse en matière de techniques de microscopie. Le professeur *Erland Liljeroth* pour sa gentillesse, son aide à résoudre les problèmes et ses suggestions perspicaces.

Erik Alexandersson, Anna Holfors, Kerry Everett, Tetyana Zhebentyayeva, Reiny Scheper et Jonathan Rees-George pour leur aide théorique et technique.

Dr. *Kristina Rumpunen* pour son aide dans les questions médicales et son hospitalité gracieuse.

Björn Canbäck pour son aide dans l'analyse bioinformatique.

Jan-Eric Englund pour ses conseils statistiques.

Jasna Sehic, Anna Zborowska et Kerstin Brismar pour leur assistance technique et leur travail en laboratoire.

Anna-Sofie Fält, Mari-Louise Skoog et Pia Ohlsson pour leur attitude sympathique et pour avoir été de si bonnes amies et collègues de bureau.

Hélen Lindgren et Annelie Ahlman pour leur sourire énergique, leur soutien sans faille et leur considération.

Le professeur *Tomas Bryngelsson* et *Åsa Olsson* pour leur soutien et leur accueil à Alnarp.

Mariette Andersson, Helena Persson Hovmalm, Anders Carlsson et Eva Johansson, pour leur aide et leurs conseils dans la résolution des problèmes dans les moments difficiles.

Mes meilleurs amis *Faiza Rasheed, Yanrong Lv, Lijie Zhong, Faraz Muneer* et sa femme pour fêter un anniversaire inoubliable à l'hôpital et tous ces moments joyeux.

Tous les doctorants, anciens et actuels, pour le partage des événements et des expériences.

Tous les membres du corps enseignant et du personnel du département de sélection végétale de Balsgård et d'Alnarp, dont les services ont permis à mes recherches d'aboutir.

Et enfin :

Je voudrais exprimer mes remerciements les plus sincères à mon mari, qui me surprend toujours par sa gentillesse, même dans les moments les plus difficiles, ainsi qu'à ma mère et à mon père. Merci pour votre amour, votre patience, votre soutien moral et émotionnel et vos encouragements.

Tu as toujours été ma plus grande motivation pour surmonter les obstacles que j'ai rencontrés.

[Voir les statistiques de publication](#)