



**HAL**  
open science

**Analyse des mécanismes de défense de la carotte  
(*Daucus carota*) face au champignon pathogène  
*Alternaria dauci*, responsable de l'alternariose ou  
brûlure foliaire**

Mickaël Lecomte

► **To cite this version:**

Mickaël Lecomte. Analyse des mécanismes de défense de la carotte (*Daucus carota*) face au champignon pathogène *Alternaria dauci*, responsable de l'alternariose ou brûlure foliaire. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2013. Français. NNT : . tel-00881134

**HAL Id: tel-00881134**

**<https://theses.hal.science/tel-00881134>**

Submitted on 7 Nov 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Thèse de Doctorat

## Mickaël LECOMTE

Mémoire présenté en vue de l'obtention  
**du grade de Docteur de l'Université d'Angers**  
Sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

**Discipline : Biochimie et biologie moléculaire (64), Biologie cellulaire (65), Physiologie (66)**  
**Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale**  
**Laboratoire : Institut de Recherche en Horticulture et Semences (UMR 1345 IRHS)**

Soutenue le 16 juillet 2013

École doctorale : VENAM  
Thèse N° 1265

## Analyse des mécanismes de défense de la carotte (*Daucus carota*) face au champignon pathogène *Alternaria dauci*, responsable de l'alternariose ou brûlure foliaire

### JURY

Rapporteurs : **M. Christophe BERTSCH**, Professeur, Université de Haute-Alsace  
**M. Pierre COUTOS-THÉVENOT**, Professeur, Université de Poitiers

Examineurs : **Mme Maria MANZANARES-DAULEUX**, Professeure, Agrocampus-Ouest Centre de Rennes  
**M. Philippe SIMONEAU**, Professeur, Université d'Angers

Directeur de Thèse : **M. Pascal POUPARD**, Maître de conférences HDR, Université d'Angers

Co-encadrant de Thèse : **M. Romain BERRUYER**, Maître de conférences, Université d'Angers



**Analyse des mécanismes de défense de la carotte  
(*Daucus carota*) face au champignon pathogène  
*Alternaria dauci*, responsable de l'alternariose ou  
brûlure foliaire**

**Thèse de doctorat**

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire végétale  
École doctorale VENAM

**Présentée et soutenue publiquement le 16 juillet 2013  
à la Faculté des sciences  
d'ANGERS**

**par Mickaël LECOMTE**

**Devant le jury ci-dessous :**

**M. Christophe BERTSCH**, rapporteur, Professeur de l'Université de Haute-Alsace  
**M. Pierre COUTOS-THÉVENOT**, rapporteur, Professeur de l'Université de Poitiers

**Mme Maria MANZANARES-DAULEUX**, examinatrice, Professeure d'Agrocampus-Ouest Centre de Rennes  
**M. Philippe SIMONEAU**, examinateur, Professeur de l'Université d'Angers

**M. Pascal POUPARD**, directeur de Thèse, Maître de conférences HDR de l'Université d'Angers  
**M. Romain BERRUYER**, co-encadrant, Maître de conférences de l'Université d'Angers

**Laboratoire :** Institut de Recherche en Horticulture et Semences (UMR 1345 IRHS)  
42 rue Georges Morel  
49071 Beaucouzé Cedex

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**

**<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**



## Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein de l'IRHS (Institut de Recherche en Horticulture et Semences) à Angers, et plus précisément dans les équipes QuaRVeg (Qualité et Résistance aux bioagresseurs des espèces légumières) et FungiSem (Pathologies Fongiques des Semences). J'ai préparé cette thèse sous la direction de Pascal POUPARD (équipe FungiSem) et j'ai bénéficié du co-encadrement de Romain BERRUYER (équipe QuaRVeg) et de Latifa HAMAMA (équipe QuaRVeg).

L'IRHS est né le 1<sup>er</sup> janvier 2012, suite au regroupement des quatre anciennes UMR (Unité Mixtes de Recherche) : GenHort, PaVé, SAGAH et PMS, sous les tutelles de l'INRA, d'Agrocampus Ouest et de l'Université d'Angers. L'IRHS conduit des projets de recherche visant à résoudre les questions de qualité et santé des produits du végétal spécialisé. Il est organisé en trois pôles de recherche travaillant respectivement sur : les rosiers et autres espèces ornementales, les fruits à pépins et les légumes, les semences et leurs pathogènes associés. Les travaux de thèse que je présenterai ici, complètent l'approche de cartographie et de génétique quantitative mise en place dans l'équipe QuaRVeg. Pour l'équipe FungiSem, ils complètent les résultats déjà obtenus au cours de la thèse de Cora BOEDO (2009) et permettent donc la poursuite de l'étude du déterminisme de l'interaction entre *Alternaria dauci* et la carotte. Les résultats obtenus apportent ainsi une connaissance plus fine de la physiologie de l'interaction carotte-*A. dauci* et du déterminisme génétique de la résistance partielle.

Par ailleurs, cette thèse a été rendue possible grâce au soutien financier de l'Institut Fédératif de Recherche « Qualité et Santé du Végétal » (IFR 149 QUASAV). Cet IFR, créé en janvier 2008, est devenu au 1<sup>er</sup> janvier 2012 la Structure Fédérative de Recherche (SFR) 4207 QUASAV. Le rôle de cette SFR QUASAV est de coordonner et de dynamiser la recherche et les partenariats dans le domaine végétal. Dans ce cadre, au cours de cette thèse, une collaboration a été initiée avec le laboratoire SONAS (Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux - EA 921, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé, Université d'Angers). Cette collaboration se développe et permet aujourd'hui l'étude fine de composés toxiques produits par *A. dauci* et de leurs effets sur la carotte.

Cette thèse de doctorat a donné lieu à la rédaction du présent mémoire de thèse déposé auprès de l'École Doctorale VENAM (Végétal-Environnement-Nutrition-Agroalimentaire-Mer), ainsi que d'un article publié dans une revue à comité de lecture (*Physiological and Molecular Plant Pathology*), d'un second en préparation et d'un 'extended abstract' publié suite à la participation à un colloque et auquel s'ajoutera un futur article. Plusieurs communications orales et communications affichées lors de congrès ont aussi été réalisées.



# Remerciements

Voilà la partie remerciements, signe pour moi que la rédaction de ce manuscrit s'achève (enfin !). Maintenant il s'agit de rester concentré afin de n'oublier personne (je m'en excuse d'avance si cela devait arriver).

Mes remerciements vont en premier lieu à Pascal POUPARD, mon directeur de thèse, qui a toujours su m'aider, m'encourager et me motiver. Je lui suis énormément reconnaissant pour les nombreuses relectures de ce manuscrit et pour le temps qu'il a consacré pour m'aider lorsque je me noyais dans les pages de ce qui n'était pas encore le présent document. Merci aussi de m'avoir guidé durant cette aventure doctorale. Mes remerciements vont ensuite à Romain BERRUYER, mon 1<sup>er</sup> co-encadrant durant cette thèse. Merci pour toute cette énergie lors de nos réunions débriefing du mercredi où nous avons pu faire avancer ce projet. Merci également de m'avoir convaincu qu'il ne fallait pas commencer par les points négatifs mais justement toujours voir le côté positif des choses. Après m'avoir aidé à sortir du pétrin de la synthèse bibliographique, j'ai enfin pu « accoucher » de cette thèse ; je te souhaite maintenant plein de courage et surtout plein de bonheur avec la petite Adélie, tout juste arrivée avant ce manuscrit. Je tiens également à remercier mon 2<sup>e</sup> co-encadrant, Latifa HAMAMA, pour sa patience, son attention, ses conseils et ses regards critiques sur mes résultats durant les travaux de culture *in vitro*. J'ai pu acquérir de solides compétences grâce à toi, merci !

Cette thèse n'aurait pas sa valeur sans le jury ; je tiens à remercier vivement ses membres d'avoir accepté de juger ce travail : Mme Maria MANZANARES-DAULEUX, M. Philippe SIMONEAU et particulièrement M. Christophe BERTSCH et M. Pierre COUTOS-THEVENOT pour leur investissement en tant que rapporteurs de ce travail, je vous souhaite une lecture agréable de cette thèse. Durant cette thèse, certaines personnes ont pu exprimer leur remarques, donner de nombreux conseils ; je tiens ici à remercier les membres du comité de thèse qui se sont réunis deux fois et qui m'ont indiqué le cap à suivre. Merci donc à Mme Maria MANZANARES-DAULEUX, M. Philippe DELAVault, Mme Mathilde BRIARD et M. Philippe SIMONEAU. Je remercie également Mathilde BRIARD en tant que chef de l'équipe QuaRVeg pour m'avoir accueilli depuis 2007 dans son équipe. Je la remercie également de m'avoir encouragé à faire cette thèse alors que j'occupais jusque là un poste d'assistant ingénieur.

Par ces quelques lignes je tiens aussi à remercier les personnes avec qui j'ai pu collaborer dans le cadre de mes travaux de recherche. Merci à Monique HENRY (société HM Clause) à qui j'ai fourni un ensemble d'échantillons de feuilles inoculées et qui m'a fournit en retour les données de biomasse fongique analysées dans ce manuscrit. Merci à Jean-Jacques HELESBEUX et Julia GATTO (laboratoire SONAS) pour la synthèse du zinniol et les analyses

des extraits fongiques utilisés durant cette thèse. Je les remercie également, ainsi que Denis SERAPHIN et Pascal RICHOMME (laboratoire SONAS) et Luis Manuel PEÑA RODRIGUEZ (Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mexique) pour les échanges et discussions scientifiques autour du zinniol et de ces extraits fongiques d'*Alternaria dauci*. Merci à David MACHEREL et Aurélia ROLLAND (IRHS, équipe MitoStress) pour l'utilisation du fluorimètre qui m'a permis l'acquisition d'un important set de données. Merci à Linda VOISINE (IRHS, équipe QuaRVeg) pour son aide précieuse au sein du laboratoire de culture *in vitro*. Et enfin, merci aux stagiaires que j'ai pu côtoyer et co-encadrer et qui ont chacun apporté une petite pierre à cette thèse : Merci à François SEMENT, Nicolas TURBULL, Charline ALENDA, Mathilde BERTHET, Melvina GYOMLAI, Claire YOYANOPOULOS et Alexandre LEGRAIN.

Cette dernière année de thèse qui fut laborieuse d'un point de vue rédactionnel, était une année avec un emploi du temps plutôt chargé : les joies d'occuper un poste d'ATER tout en finissant de rédiger. Je remercie donc les collègues des enseignements de génétique et de phytopathologie de m'avoir aidé dans ces missions nouvelles pour moi. Merci à Catherine AUBRY, Marie-Christine LE PAVEN, Romain BERRUYER, Jérémy CLOTAULT (ex-roi de la carotte), Tristan BOUREAU et Thomas GUILLEMETTE. Durant cette année, il m'a fallu m'adapter à un nouvel environnement : les bureaux de l'Université d'Angers. Je remercie l'ensemble des collègues de l'Université pour leur accueil. Un merci particulier à Elisabeth PLANCHET pour m'avoir laissé un petit coin de bureau et pousser quelques unes de ses affaires afin que je pose les miennes ; la colocation entre ALSA et FungiSem/QuaRVeg restera un bon souvenir. Merci également à Bruno HAMON, Sandrine PIGNE, Benoît CALMES, Guillaume N'GUYEN, Isabelle VERDU, Anthony PELLIZZARO, Caroline CUKIER, Thibault CLOCHARD et les autres.

Mais avant ce passage du côté 'universitaire', j'occupais un bureau à Agrocampus Ouest. Merci à mes anciens colocataires de bureau : Fatoumata SANE bon courage à toi et je te souhaite plein de réussite, Matthieu JOURDAN je t'avais abandonné à ton sort dans ce grand bureau vide, je te souhaite maintenant de pouvoir rédiger toi aussi ta thèse dans les meilleures conditions ; courage c'est la dernière ligne droite (je sais, je suis bien placé pour le dire maintenant). Merci à toi aussi Camille LI-MARCHETTI, toute nouvelle doctorante, d'avoir repris ma place dans ce bureau afin de surveiller Matthieu et toutes les plantes vertes qui habitent ce lieu. Après avoir passé cinq ans dans les labos d'Agrocampus Ouest je tiens aussi à remercier tous ceux que j'ai côtoyés là-bas, que ce soit pour des échanges scientifiques, techniques mais aussi les moments de détente. Merci à Valérie LE CLERC, Emmanuel GEOFFRIAUX, Séverine GAGNE, Sébastien HUET, Anita SUEL mais aussi aux membres des autres équipes toujours là pour détendre l'atmosphère (Laurent, Mickaël, Denis, etc.). Un grand merci également à Audrey CHAPUT-BARDY, ex-membre de l'équipe QuaRVeg avec qui on se retrouvait près de la machine à café de la fac pour parler statistiques ou autres (surtout autres).

Je souhaite faire une attention particulière à mon futur employeur qui me donnera la conviction que tout ceci n'a pas été vain.

Comment pourrais-je oublier tous ceux qui m'entourent au-delà du cadre du laboratoire, même si, il faut l'avouer, une thèse empiète un peu sur cet espace. Merci de m'avoir soutenu et de vous être montré patient, promis je reprends une vie sociale. Merci à Christophe, Virginie, Élodie (je t'attends de pied ferme pour la soutenance), David, Bérengère, Guillaume et tous les autres. Merci également à ma famille qui, même si elle n'a pas toujours bien compris le fondement de ce que je faisais, comprenait mon investissement. Une pensée particulière pour mon papa qui n'est pas au mieux de sa forme mais qui, je l'espère, est fier de moi. On dit que l'on garde toujours le meilleur pour la fin, je tiens finalement à remercier ma Lucille, qui s'est montrée patiente (malgré que ce ne soit pas sa qualité première), compréhensive, qui m'a soutenu tout au long de cette thèse. Maintenant on a tant de choses à réaliser...



# Table des Matières

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>1. LA PLANTE HOTE : LA CAROTTE.....</b>	<b>6</b>
1.1. DESCRIPTION BOTANIQUE .....	6
1.1.1. <i>Description et identification</i> .....	6
1.1.2. <i>Taxonomie</i> .....	8
1.1.3. <i>Origine et histoire de la carotte cultivée</i> .....	9
1.1.3.1. Une plante médicinale antique.....	9
1.1.3.2. Domestication en Asie centrale .....	9
1.1.3.3. Un centre de diversification secondaire en Europe .....	9
1.1.3.4. Une autre évolution en Asie du Sud-Est .....	10
1.1.3.5. Le monopole de la carotte orange.....	10
1.2. CYCLE DE VIE DE LA CAROTTE CULTIVEE .....	10
1.2.1. <i>Première année : le développement végétatif</i> .....	10
1.2.1.1. Stades de développement .....	10
1.2.1.2. La racine, partie consommée de la carotte.....	11
1.2.2. <i>Deuxième année : la phase reproductive</i> .....	12
1.3. CULTURE ET PRODUCTION.....	13
1.3.1. <i>Exigences pédoclimatiques</i> .....	13
1.3.2. <i>Diversité des productions</i> .....	13
1.3.3. <i>Itinéraire phytotechnique</i> .....	14
1.3.4. <i>Diversité des types cultivés</i> .....	15
1.4. IMPORTANCE ECONOMIQUE.....	17
1.4.1. <i>Contexte mondial</i> .....	17
1.4.2. <i>Contexte national</i> .....	17
1.4.3. <i>Contexte régional</i> .....	19
1.5. SELECTION VARIETALE .....	20
1.5.1. <i>Objectifs de la sélection</i> .....	20
1.5.2. <i>Sélection appliquée à la carotte</i> .....	20
1.5.3. <i>Caractères travaillés en création variétale chez la carotte</i> .....	21
1.6. MALADIES ET RAVAGEURS DE LA CAROTTE .....	22
1.6.1. <i>Les maladies racinaires</i> .....	22
1.6.1.1. Fontes de semis .....	22
1.6.1.2. Maladies de conservation.....	23
1.6.2. <i>Les maladies foliaires</i> .....	24
1.6.2.1. Brûlures foliaires .....	24
1.6.2.2. Autres maladies .....	24
1.6.2.3. Viroses .....	25
1.6.3. <i>Les ravageurs</i> .....	25
1.6.3.1. La mouche de la carotte .....	25
1.6.3.2. Pucerons de la carotte .....	25
1.6.3.3. Nématodes .....	25
1.7. LA CAROTTE, UN MODELE EN CULTURE <i>IN VITRO</i> .....	26
1.7.1. <i>Bref historique de la culture in vitro</i> .....	26
1.7.2. <i>Les suspensions cellulaires</i> .....	27
1.7.3. <i>L'embryogenèse somatique</i> .....	27
<b>2. L'AGENT PATHOGENE : ALTERNARIA DAUCI.....</b>	<b>29</b>
2.1. DEGATS ET IMPORTANCE ECONOMIQUE DE L'ALTERNARIOSE .....	29

2.2. PRESENTATION DE L'ESPECE <i>ALTERNARIA DAUCI</i> .....	30
2.2.1. Le genre <i>Alternaria</i> .....	30
2.2.2. L'espèce <i>Alternaria dauci</i> .....	31
2.3. SYMPTOMATOLOGIE DE LA MALADIE .....	32
2.4. ÉPIDEMIOLOGIE ET CYCLE PARASITAIRE .....	34
2.4.1. Infection primaire .....	34
2.4.2. Développement du champignon sur la plante hôte.....	35
2.5. DETERMINISME DU POUVOIR PATHOGENE .....	36
2.5.1. Les toxines fongiques.....	37
2.5.2. Les toxines d' <i>Alternaria spp.</i> .....	38
2.6. GAMME D'HOTES ET AGRESSIVITE CHEZ L'ESPECE <i>A. DAUCI</i> .....	39
2.7. METHODES DE LUTTE .....	40
2.7.1. Semences saines .....	40
2.7.2. Méthodes culturales .....	41
2.7.3. Lutte chimique durant la culture.....	41
2.7.4. Lutte génétique.....	42
<b>3. L'INTERACTION PLANTE HOTE/AGENTS PATHOGENES.....</b>	<b>45</b>
3.1. GENERALITES ET DEFINITIONS .....	45
3.1.1. Les différents types de résistance .....	45
3.1.2. Le point de vue de l'améliorateur .....	46
3.2. RECONNAISSANCE HOTE/AGENT PATHOGENE .....	47
3.3. DERRIERE LA RESISTANCE VERTICALE : PROTEINES DE RESISTANCE ET PROTEINES D'AVIRULENCE .....	49
3.4. MECANISMES DE DEFENSE .....	51
3.4.1. Transduction du signal.....	51
3.4.1.1. Activation précoce de gènes de défense .....	52
3.4.1.2. Accumulation de phytohormones .....	52
3.4.1.3. La voie de l'acide salicylique .....	53
3.4.1.4. La voie des jasmonates .....	54
3.4.1.5. Interaction entre ces deux voies.....	56
3.4.2. Mécanismes de défense induits .....	57
3.4.2.1. La réaction hypersensible (HR) .....	57
3.4.2.2. Les PR protéines .....	57
3.4.2.3. Autres protéines de défense.....	59
3.4.2.4. Les phytoalexines.....	59
3.5. RESISTANCE AUX TOXINES .....	60
3.5.1. Détoxification : l'interaction maïs/ <i>Cochliobolus carbonum</i> race 1 .....	61
3.5.2. Contournement métabolique : l'interaction tomate/ <i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	62
3.6. DERRIERE LA RESISTANCE HORIZONTALE : DES MECANISMES DIVERS ET MAL CONNUS .....	63
<b>4. LA RESISTANCE DE LA CAROTTE FACE A <i>ALTERNARIA DAUCI</i> : MISE AU POINT D'UNE STRATEGIE DE RECHERCHE .....</b>	<b>67</b>
4.1. DETERMINISME GENETIQUE .....	67
4.2. DIVERSITE DES RESISTANCES .....	68
4.3. QUELS MECANISMES ? ÉLABORATION D'UNE QUESTION DE RECHERCHE .....	68
4.4. COMMENT TESTER NOS HYPOTHESES ? ÉLABORATION D'UNE STRATEGIE DE RECHERCHE .....	70
<b>CHAPITRE II : IMPLICATION DES MOLECULES DE DEFENSE .....</b>	<b>71</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>72</b>
<b>2. ARTICLE .....</b>	<b>74</b>
2.1. INTRODUCTION .....	74
2.2. MATERIALS AND METHODS .....	75
2.2.1. Fungal strains, culture conditions and preparation of conidial suspensions .....	75
2.2.2. Antimicrobial metabolites.....	76
2.2.3. Measurement of in vitro conidial germination and germ tube elongation after 6-MM treatment... 76	

2.2.4. Measurement of fungal growth by nephelometry.....	76
2.2.5. SYTOX green uptake assays.....	76
2.2.6. HPLC determination of 6-MM levels in carrot leaves.....	77
2.2.7. UHPLC–ESI–MS determination of falcarinol and falcarindiol levels in carrot leaves .....	77
2.2.8. Statistical analysis.....	78
2.3. RESULTS.....	78
2.3.1. <i>In vitro</i> susceptibility of <i>Alternaria</i> spp. strains to 6-MM assessed by microscopical methods and nephelometry.....	78
2.3.2. <i>In planta</i> quantification of 6-MM in two <i>A. dauci</i> -inoculated carrot genotypes .....	79
2.3.3. <i>In vitro</i> susceptibility of <i>A. dauci</i> and <i>A. brassicicola</i> strains to falcarinol and falcarindiol and <i>in planta</i> quantification of polyacetylenes .....	79
2.3.4. Membrane permeabilization assays using 6-MM or falcarindiol and assessment of a potential interaction effect between the two metabolites .....	80
2.4. DISCUSSION.....	80
2.5. SUPPLEMENTARY DATA.....	84
<b>3. CONCLUSION .....</b>	<b>85</b>
<b>CHAPITRE III : MECANISMES DE RESISTANCE AUX TOXINES .....</b>	<b>87</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>88</b>
<b>2. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>90</b>
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE .....	90
2.1.1. <i>Choix des génotypes de carotte</i> .....	90
2.1.2. <i>Choix de la souche d'Alternaria dauci</i> .....	90
2.2. DONNEES PHENOTYPIQUES SUR PLANTE ENTIERE .....	91
2.2.1. <i>Obtention des plantes</i> .....	91
2.2.2. <i>Culture d'Alternaria dauci et obtention des conidies</i> .....	91
2.2.3. <i>Inoculation</i> .....	91
2.2.4. <i>Notation des symptômes</i> .....	92
2.2.5. <i>Quantification de la biomasse fongique par qPCR</i> .....	92
2.2.6. <i>Dispositif expérimental</i> .....	93
2.2.7. <i>Analyses statistiques</i> .....	93
2.3. OBTENTION DES FILTRATS DE CULTURE FONGIQUE ET DU ZINNIOL .....	93
2.3.1. <i>Culture du champignon en milieu liquide</i> .....	93
2.3.2. <i>Filtrat brut</i> .....	93
2.3.3. <i>Fractions aqueuse et organique</i> .....	94
2.3.4. <i>Synthèse, dosage et stabilité du zinniol</i> .....	95
2.3.4.1. <i>Synthèse</i> .....	95
2.3.4.2. <i>Détection et dosage</i> .....	95
2.3.4.3. <i>Stabilité</i> .....	95
2.4. OBTENTION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE CAROTTE .....	96
2.4.1. <i>Introduction de plantes in vitro et obtention de cals friables</i> .....	96
2.4.2. <i>Culture des cellules en milieu liquide</i> .....	96
2.5. TRAITEMENT DES CELLULES PAR LES FRACTIONS FONGIQUES.....	97
2.5.1. <i>Préparation des fractions et du zinniol</i> .....	97
2.5.2. <i>Traitement des cellules</i> .....	97
2.6. ÉVALUATION DE LA TOXICITE DES FRACTIONS FONGIQUES SUR LES CELLULES DE CAROTTE.....	98
2.6.1. <i>Suivi de la conversion des cellules en embryons somatiques</i> .....	98
2.6.2. <i>Aspects microscopiques des cellules</i> .....	98
2.6.2.1. <i>Tests de viabilité cellulaire : bleu Evans et fluorescéine diacétate</i> .....	98
2.6.2.2. <i>Observation des noyaux : test avec le DAPI</i> .....	98
2.6.3. <i>Utilisation de l'activité hydrolytique intracellulaire comme marqueur de la toxicité</i> .....	99
2.6.3.1. <i>Extraction des enzymes</i> .....	99
2.6.3.2. <i>Réaction enzymatique</i> .....	99
2.6.3.3. <i>Dosage de protéines</i> .....	99
2.6.3.4. <i>Calcul de l'activité enzymatique spécifique</i> .....	100

2.6.3.5. Dispositif expérimental .....	100
2.6.3.6. Traitements statistiques.....	101
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>102</b>
3.1. DONNEES PHENOTYPIQUES SUR PLANTE ENTIERE .....	102
3.1.1. Notations visuelles des symptômes .....	102
3.1.2. Quantification de la biomasse fongique par qPCR.....	103
3.1.3. Comparaison des deux méthodes.....	104
3.2. RESISTANCE AUX FRACTIONS FONGIQUES ET AU ZINNIOL.....	105
3.2.1. Mises au point méthodologiques.....	105
3.2.2. Résultats des tests <i>in vitro</i> .....	106
3.2.2.1. Aspects macroscopiques.....	106
3.2.2.2. Aspects microscopiques .....	110
3.2.2.3. Aspect biochimique .....	111
3.3. DOSAGE DU ZINNIOL.....	115
3.3.1. Stabilité du zinniol.....	115
3.3.2. Dosage du zinniol dans les extraits fongiques .....	115
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>117</b>
<b>CHAPITRE IV : POLYMORPHISME ET NIVEAU D'EXPRESSION DE GENES LIES A LA VOIE DE L'ACIDE JASMONIQUE</b> .....	<b>121</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>122</b>
<b>2. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>124</b>
2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE .....	124
2.2. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES .....	124
2.2.1. Extraction d'ADN.....	124
2.2.2. Extraction d'ARN .....	125
2.3. MISE EN EVIDENCE DE GENES CANDIDATS.....	125
2.3.1. Recherche bibliographique des gènes candidats et alignements .....	125
2.3.2. Conception des amorces .....	127
2.3.3. Amplification par PCR des gènes candidats.....	128
2.3.4. Révélation des fragments amplifiés.....	128
2.3.5. Clonage et séquençage des produits d'amplification.....	129
2.3.5.1. Ligation .....	129
2.3.5.2. Désalage du milieu réactionnel .....	129
2.3.5.3. Transformation de bactéries compétentes .....	129
2.3.5.4. Séquençage.....	129
2.3.5.5. Analyse des séquences obtenues .....	129
2.3.6. Séquençage des gènes candidats chez les six génotypes.....	130
2.4. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE GENES DES VOIES DE SIGNALISATION.....	131
2.4.1. Obtention du matériel végétal inoculé par <i>A. dauci</i> .....	131
2.4.2. Mesure de l'expression de gènes .....	132
2.4.2.1. Transcription inverse de l'ARN .....	132
2.4.2.2. Définition des amorces .....	132
2.4.2.3. Sélection de gènes de ménage .....	132
2.4.2.4. Réaction de PCR quantitative .....	133
2.4.3. Méthode d'analyse des données.....	133
2.4.4. Analyses statistiques.....	134
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>135</b>
3.1. NIVEAU D'EXPRESSION DE GENES DES VOIES DE SIGNALISATION LIEES A L'ACIDE JASMONIQUE, L'ETHYLENE OU L'ACIDE SALICYLIQUE .....	135
3.1.1. Calcul des niveaux d'expression des gènes .....	135
3.1.1.1. Niveaux d'expression brute des gènes cibles et des gènes de ménage, et calcul de l'efficacité des amorces .....	135
3.1.1.2. Validation des gènes de ménage .....	135

3.1.2. Recherche de gènes différentiellement exprimés en fonction des génotypes et de l'inoculation par <i>Alternaria dauci</i> .....	136
3.1.3. Expression du gène PR4 .....	137
3.2. RECHERCHE DE POLYMORPHISME DANS DES GENES DE LA VOIE DE L'ACIDE JASMONIQUE .....	138
3.2.1. Conception des amorces dégénérées.....	138
3.2.2. Amplification avec les amorces dégénérées et clonage des produits amplifiés .....	138
3.2.3. Obtention de séquences homologues chez la carotte.....	138
3.2.4. Polymorphisme des gènes candidats observé chez les six génotypes sélectionnés .....	139
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>155</b>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	161
ANNEXES .....	183



# Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Plant de carotte adulte. Reproduction d'une peinture du botaniste suédois Carl Axel Magnus Lindman (1856-1928) .....	7
<b>Figure 2</b> : Schéma global de l'organisation du complexe <i>Daucus carota</i> .....	8
<b>Figure 3</b> : Les stades de développement de la carotte.....	11
<b>Figure 4</b> : Récolte de carotte par préhension du feuillage .....	14
<b>Figure 5</b> : Formes typiques de la racine de carotte .....	15
<b>Figure 6</b> : Répartition de la production française en 2010.....	18
<b>Figure 7</b> : Quantités achetées et prix moyen d'achat des carottes en France pour la campagne 2010/2011 .....	19
<b>Figure 8</b> : Morphologie d' <i>Alternaria dauci</i> .....	31
<b>Figure 9</b> : Symptômes d' <i>A. dauci</i> sur carotte .....	33
<b>Figure 10</b> : Développement et symptômes de maladies causées par <i>Alternaria</i> spp. ....	34
<b>Figure 11</b> : Conidie d' <i>A. dauci</i> en germination à la surface d'une feuille de carotte.....	35
<b>Figure 12</b> : Molécule de zinniol .....	38
<b>Figure 13</b> : Modèle en zigzag illustrant les réponses quantitatives de résistance des plantes lors de la reconnaissance d'un agent pathogène .....	48
<b>Figure 14</b> : Principales classes de gènes de résistance R chez les plantes, basées sur l'organisation de leurs domaines fonctionnels .....	49
<b>Figure 15</b> : Voies de signalisation des mécanismes de défense chez les plantes .....	52
<b>Figure 16</b> : Effet des phytohormones dans la résistance aux stress biotiques .....	53
<b>Figure 17</b> : La voie des jasmonates : Biosynthèse et modifications de l'acide jasmonique.....	55
<b>Figure 18</b> : Modèle de fonctionnement général de l'activation de l'expression des gènes liés aux jasmonates ..	56
<b>Figure 19</b> : Structure moléculaire de la toxine HC produite par <i>C. carbonum</i> , et de sa forme réduite, induite par l'activité HCTR conférée par <i>Hm1</i> .....	61
<b>Figure 20</b> : Structures moléculaires de la sphinganine, du céramide et de la toxine AAL T <sub>A</sub> 1 .....	62
<b>Figure 21</b> : Le concept de guerre chimique.....	64
<b>Figure 22</b> : Inoculation en gouttes sur feuille non détachée.....	92
<b>Figure 23</b> : Schéma d'obtention des différents extraits fongiques.....	94
<b>Figure 24</b> : Schéma réactionnel de la synthèse chimique du zinniol.....	95
<b>Figure 25</b> : Détermination de la vitesse de réaction d'hydrolyse de la FDA.....	100
<b>Figure 26</b> : Boxplot de l'AUDPC et du log(AUDPC) en fonction du génotype .....	102
<b>Figure 27</b> : Boxplot du log(I+1) en fonction du génotype.....	104
<b>Figure 28</b> : Corrélation entre le log(I+1) et le log(AUDPC). ....	105
<b>Figure 29</b> : Observations sous loupe binoculaire des suspensions de cellules de carotte après 15 jours de traitement avec le filtrat brut .....	106
<b>Figure 30</b> : Développement d'embryons à partir des suspensions de Presto (P), H1 et K3 après quatre semaines de traitement avec la fraction aqueuse .....	107
<b>Figure 31</b> : Développement d'embryons à partir des suspensions cellulaires après trois semaines de traitement avec différentes concentrations de zinniol .....	109
<b>Figure 32</b> : Cellules colorées avec (a) Bleu Evans, (b) FDA (fluorescéine diacétate), (c) DAPI .....	111
<b>Figure 33</b> : Effet des extraits fongiques sur l'activité enzymatique spécifique des six génotypes .....	114
<b>Figure 34</b> : Mesure de la stabilité du zinniol dans le milieu de culture Gamborg (pH 5,8) en fonction du temps	

par analyse CLHP .....	115
<b>Figure 35</b> : Chromatogramme d'un extrait organique oA .....	116
<b>Figure 36</b> : Expression du gène <i>PR4</i> chez les six génotypes en fonction du temps après inoculation .....	137
<b>Figure 37</b> : Séquences du gène <i>JAR1</i> obtenues à partir des amorces RB90F et RB90R chez les six génotypes de carotte .....	140
<b>Figure 38</b> : Séquences du gène <i>PAL</i> obtenues à partir des amorces RB91F et RB91R chez les six génotypes de carotte .....	141
<b>Figure 39</b> : Alignement des séquences en acides aminés correspondant au gène <i>PAL</i> obtenues à partir des amorces RB91F et RB91R chez les six génotypes de carotte .....	141
<b>Figure 40</b> : Séquences du gène <i>PAL</i> obtenues à partir des amorces RB92F et RB92R chez les six génotypes de carotte .....	142
<b>Figure 41</b> : Alignement des séquences en acides aminés correspondant au gène <i>PAL</i> obtenues à partir des amorces RB91F et RB91R chez les six génotypes de carotte .....	142
<b>Figure 42</b> : Séquences du gène <i>PAL</i> obtenues à partir des amorces RB91F/RB91R et RB92F/RB92R chez les six génotypes .....	143
<b>Figure 43</b> : Alignement des séquences consensus du gène <i>PAL</i> , traduites en acides aminés .....	144
<b>Figure 44</b> : Séquences du gène <i>GLP</i> obtenues à partir des amorces RB93F et RB93R chez les six génotypes de carotte .....	145
<b>Figure 45</b> : Alignement des séquences en acides aminés du gène <i>GLP</i> obtenues à partir des amorces RB93F et RB93R chez les six génotypes .....	146
<b>Figure 46</b> : Séquences du gène <i>GLP</i> obtenues à partir des amorces RB94F et RB94R chez quatre génotypes de carotte .....	147
<b>Figure 47</b> : Alignement des séquences consensus du gène <i>GLP</i> , traduites en acides aminés .....	148
<b>Figure 48</b> : Séquences du gène <i>PR1</i> obtenues à partir des amorces RB95F et RB95R chez les six génotypes de carotte .....	148
<b>Figure 49</b> : Haplotypes du gène <i>PAL-a</i> obtenus à partir des amorces RB91F et RB91R chez les six génotypes ..	151
<b>Figure 50</b> : Haplotypes du gène <i>PAL-b</i> obtenus à partir des amorces RB92F et RB92R chez les six génotypes ..	151
<b>Figure 51</b> : Haplotypes du gène <i>GLP-b</i> obtenus à partir des amorces RB93F et RB93R chez les six génotypes ..	152

# Table des Tableaux

<b>Tableau I</b> : Évolution des prix, de la surface et du volume récolté en France entre 2006 et 2010 .....	18
<b>Tableau II</b> : Exemples de gènes de résistance R en fonction des différents domaines fonctionnels .....	50
<b>Tableau III</b> : Propriétés des différentes familles de protéines PR.....	58
<b>Tableau IV</b> : Classement des génotypes en fonction du log(AUDPC).....	103
<b>Tableau V</b> : Classement des génotypes en fonction du log(I+1) .....	104
<b>Tableau VI</b> : Synthèse des observations macroscopiques des suspensions cellulaires traitées avec les différentes fractions fongiques et le zinniol.....	110
<b>Tableau VII</b> : Classement des génotypes en fonction de leur sensibilité aux extraits fongiques et au zinniol....	118
<b>Tableau VIII</b> : Présentation des gènes candidats et de leur fonction.....	126
<b>Tableau IX</b> : Amorces conçues à partir des fragments clonés spécifiques de l'espèce carotte.....	130
<b>Tableau X</b> : Amorces conçues à partir des fragments clonés spécifiques de l'espèce carotte : Amorces définies pour l'étude de l'expression des gènes des voies de signalisation par PCR en temps réel.....	132
<b>Tableau XI</b> : Amorces définies pour l'étude de l'expression des gènes de ménage, calibrateurs internes de la PCR en temps réel.....	133
<b>Tableau XII</b> : Coefficients de corrélation r entre les valeurs de Ct obtenus pour chacun des gènes de ménage sur l'ensemble des échantillons d'ADNc .....	136



## Introduction générale

Au cours de leur développement, les plantes sont continuellement soumises à un ensemble de bioagresseurs. Ces bioagresseurs, lorsqu'ils provoquent des maladies et dégâts aux plantes, peuvent avoir un fort impact sur la production agricole. Cependant, dans le cadre d'une agriculture largement intensive, l'usage de produits phytosanitaires est devenu quasiment systématique car, en contrôlant ces bioagresseurs, il permet de maintenir un haut niveau de productivité. Mais dans un contexte de plus en plus focalisé sur le respect de l'environnement et la santé publique, les stratégies de lutte tendent à privilégier des pratiques limitant les intrants notamment l'utilisation de pesticides.

La mise en œuvre de l'objectif de « réduction de moitié des usages des pesticides en accélérant la diffusion des méthodes alternatives sous réserve de leur mise au point » du plan Ecophyto 2018 renforce la nécessité d'étudier en détail les interactions plantes/agents pathogènes afin d'adapter les stratégies de lutte au contexte phytosanitaire. Parmi ces méthodes, l'utilisation de variétés résistantes est une des pistes les plus travaillées aujourd'hui. Mais encore faut-il que ces résistances soient durables. En effet, des gènes de résistance introduits dans des lignées végétales sont devenus inefficaces lorsque l'agent pathogène a pu s'adapter et contourner la résistance. Il existe des résistances dites totales, contrôlées par un gène et des résistances dites partielles, généralement sous contrôle multigénique, auxquelles nous allons nous intéresser plus particulièrement.

Afin de développer des stratégies innovantes d'utilisation et de gestion de ces résistances partielles, il est nécessaire de comprendre les mécanismes qui y sont associés. En effet la connaissance de ces mécanismes pourrait permettre de mieux raisonner le choix des facteurs à associer, selon l'hypothèse que la diversité des mécanismes limiterait la vitesse d'adaptation des populations pathogènes. Or, les mécanismes associés aux résistances partielles restent encore largement méconnus. Le travail qui est présenté ici s'inscrit dans cette démarche de compréhension des mécanismes de résistance partielle et plus particulièrement ceux de la carotte face à *Alternaria dauci*, champignon pathogène responsable de l'alternariose ou brûlure foliaire.

La carotte (*Daucus carota* L.) est le légume racine le plus consommé dans le monde et arrive en seconde place parmi les productions légumières en France ; sa production mondiale est en constante progression. Cependant, les producteurs de carotte de consommation ou de carotte porte-graine doivent faire face à des épidémies de brûlure foliaire qui peuvent détruire partiellement ou intégralement leurs cultures.

*Alternaria dauci* cause des nécroses brunes sur l'ensemble des organes aériens ce qui

engendre le flétrissement de l'ensemble du feuillage et la destruction de celui-ci. *A. dauci* est considéré comme l'un des agents pathogènes les plus importants en production de carottes car en fragilisant le feuillage, il empêche la récolte mécanique qui s'effectue par préhension des fanes. *A. dauci* peut être transmis par les semences de carotte, ce qui en fait un agent pathogène également redouté des agriculteurs-multiplicateurs de semences.

C'est dans ce contexte que les sélectionneurs de l'espèce cherchent depuis plusieurs décennies à développer des variétés résistantes à la brûlure foliaire. Il n'existe actuellement aucune variété commerciale totalement résistante à cet agent pathogène et les travaux de sélection se poursuivent dans différents pays. La résistance de la carotte vis-à-vis d'*A. dauci* n'étant pas contrôlée par un ni plusieurs gènes majeurs, une des voies les plus prometteuses est d'orienter les recherches vers une stratégie de cumul de résistances partielles dans un même génotype. Des sources de résistances partielles et polygéniques sont identifiées mais les mécanismes de cette résistance partielle sont mal connus.

Afin de pouvoir les étudier plus en détail, plusieurs approches sont actuellement utilisées au sein du laboratoire. L'équipe QuaRVeg, travaillant en collaboration avec les sociétés semencières Vilmorin et HM-Clause sur la caractérisation de la résistance de la carotte à *A. dauci*, a mis en évidence des QTL de résistance ; ces travaux ont confirmé la nature polygénique de la résistance. L'équipe FungiSem, quant à elle, travaille sur les déterminants de l'interaction du côté de l'agent pathogène. À long terme, ces travaux permettront d'améliorer les conditions de mise en place de la lutte génétique via l'utilisation de sources de résistance partielle et durable vis-à-vis d'*A. dauci*. Cependant la mise en œuvre de ce programme de sélection nécessite de pouvoir formuler des hypothèses sur les fonctions biologiques sous-jacentes à l'action des QTL identifiés. Il devient donc nécessaire d'acquérir des connaissances précises sur les déterminants moléculaires de l'interaction plante-pathogène. Cette thèse s'inscrit donc dans une thématique axée sur la caractérisation de gènes impliqués dans la résistance.

Lors de l'interaction entre une plante et un bioagresseur, un dialogue moléculaire s'initie et oriente les réactions des deux organismes. Une plante peut, par exemple synthétiser de façon constitutive (phytoanticipines) ou suite à la détection d'un agent pathogène (phytoalexines) des composés qui auront une action à l'encontre du bioagresseur, on parle alors de molécules de défense. De son côté, l'agent pathogène possède un arsenal métabolique lui permettant de s'installer sur une plante hôte. Mais ces composés toxiques pour la plante peuvent être contrés par celle-ci et ainsi elle sera capable d'annuler leurs effets. Par ailleurs, dans l'objectif d'amélioration variétale, l'expérimentateur distingue les lignées sensibles à l'agent pathogène et celles qui lui sont résistantes. La différence entre une plante résistante et une plante sensible a une origine génétique, la variation de séquence ou de niveau d'expression de gènes influant sur cette capacité de résistance. Certains gènes sont connus pour leur rôle dans des interactions entre des organismes végétaux et des agents pathogènes nécrotrophes.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de défense de la carotte face à *A. dauci*. Le document est construit en quatre chapitres. Afin de situer la problématique et le contexte scientifique et socio-économique, une synthèse bibliographique permet de faire le point sur les connaissances actuelles concernant le pathosystème étudié ainsi que les mécanismes de résistance et de défense des plantes face à une agression pathogène (Chapitre I).

Les travaux développés ont visé, dans un premier temps, à appréhender le rôle de molécules de défense produites par la carotte dans la résistance face à *A. dauci*. Nous avons effectué un dosage de ces molécules chez des plantes inoculées avec le champignon et mesuré l'impact de ces molécules sur le développement du champignon (Chapitre II).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au lien entre la résistance des plantes face au champignon et la résistance des cellules végétales aux composés toxiques produits par le champignon. La résistance à ces composés toxiques a été testée en étudiant le comportement de cultures cellulaires de carotte mises en contact avec des extraits de culture du champignon (Chapitre III).

Enfin, nous avons mené une approche avec *a priori* en étudiant, chez la carotte, des gènes de défense et de transduction du signal liés à la voie de l'acide jasmonique. D'une part, nous avons réalisé une analyse de l'expression de ces gènes en réponse à l'inoculation de la plante par le champignon, d'autre part, nous avons recherché des SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism) au sein de ces gènes afin de mettre en évidence du polymorphisme entre génotypes sensibles et génotypes partiellement résistants (Chapitre IV). Ces résultats sont exploités dans le travail de cartographie de la résistance partielle actuellement réalisé dans l'équipe QuaRVeg.

« Pour la carotte, le lapin est la parfaite incarnation du Mal. »  
Robert Sheckley



## **Chapitre I :**

### **Synthèse bibliographique**

# 1. La plante hôte : la carotte

## 1.1. Description botanique

### 1.1.1. Description et identification

La carotte est une plante de taille moyenne (0,6 à 2 m au moment de la floraison). Nous la connaissons pour sa racine pivotante développée en organe de réserve (Fig. 1), charnue, cassante, pigmentée (rarement blanche), agréable au goût et non ramifiée (en sol meuble, sans obstacle) (Reduron, 2007). Les feuilles sont minces, souvent mates, avec un pourtour triangulaire (Fig. 1). Elles sont très divisées-pennées, à divisions écartées très allongées, étroites, linéaires ou lancéolées-linéaires (Reduron, 2007). Les inflorescences sont constituées de grandes ombelles composées de fleurs blanches jaunâtres, allogames et protandres<sup>1</sup>, regroupées en ombellules. Chaque fleur est constituée de cinq sépales, cinq pétales, cinq étamines et deux carpelles (Tirilly et Bourgeois, 1999). La présence d'une fleur pourpre centrale est très variable chez la sous-espèce *sativus* (Fig. 1). Lors de la maturation des fruits, les rayons de l'ombelle se referment en urne (Reduron, 2007). Le fruit (communément appelé graine de façon abusive) est un diakène albuminé de forme elliptique (Fig. 1) (Tirilly et Bourgeois, 1999).

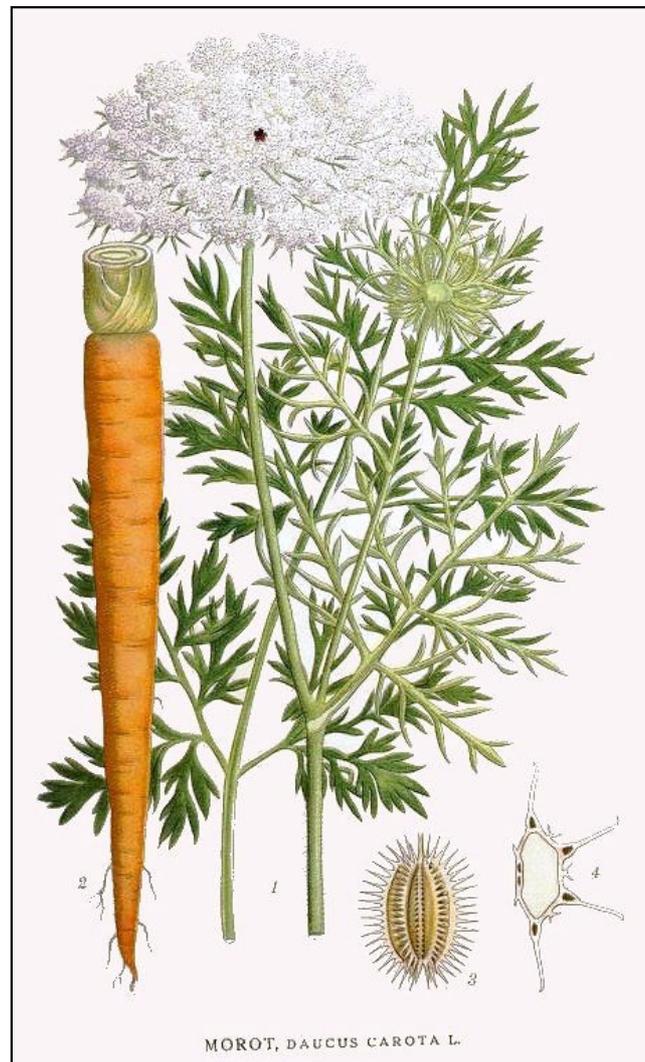
La carotte est une plante diploïde et possède  $2n = 18$  chromosomes, aucune modification de ploïdie ne semble avoir joué un rôle dans la différenciation de la forme cultivée (Chaux et Foury, 1994). Son génome a une taille de 473 Mbp (génome haploïde ; Arumuganathan et Earle, 1991), ce qui est quatre fois celui d'*Arabidopsis thaliana*, égal à celui du riz (*Oryza sativa*) et la moitié de celui de la tomate (*Solanum lycopersicum*). La taille de sa carte génétique est estimée à 900 cM (Vivek et Simon, 1999).

Jusqu'à très récemment, peu de données moléculaires étaient disponibles concernant la carotte (Cavagnaro *et al.*, 2008). Des séquences issues d'un projet de transcriptome ont seulement été publiées depuis peu (Iorizzo *et al.*, 2011). Le séquençage de son génome est en

---

<sup>1</sup> Se dit d'une fleur dont les anthères sont mûres avant les stigmates.

cours dans le cadre d'un projet confidentiel établi au niveau mondial entre plusieurs firmes semencières et quatre laboratoires de recherche publique, dont l'équipe 'QuaRVeg' de l'IRHS.



**Figure 1 :** Plant de carotte adulte. Reproduction d'une peinture du botaniste suédois Carl Axel Magnus Lindman (1856-1928), extraite de son livre 'Bilder ur Nordens Flora' (1901-1905) (Wikipédia [Internet]).

La carotte est utilisée pour l'alimentation, c'est son utilisation la plus connue (consommation de sa racine). Mais on peut noter que l'huile essentielle de carotte, par distillation des semences, est employée en parfumerie et aromathérapie. Le carotol (alcool sesquiterpénique) est le composant majoritaire de l'huile, qui contient également du daucène, de l' $\alpha$ -pinène, du limonène, du sabinène, de l'acétate de géranyle... (Gonny *et al.*, 2004 ; Reduron, 2007 ; Staniszewska *et al.*, 2005).

Parmi les autres usages marginaux, on peut aussi mentionner son emploi comme plante tinctoriale, par exemple pour colorer le beurre ou certains fromages (Bergeret *et al.*, 1909 in Reduron, 2007). Plus récemment, la production de pigments alimentaires à partir de la racine de carotte, notamment des variétés à chair violette, s'est développée (Downham et Collins, 2000 ; Geoffriau, com. pers.).

### 1.1.2. Taxonomie

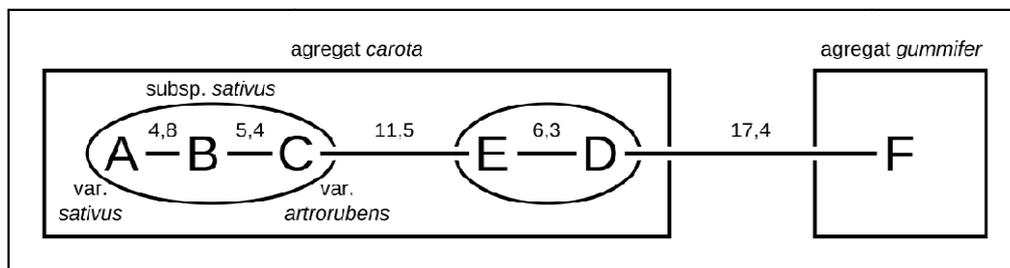
La carotte (*Daucus carota* L.) est une plante bisannuelle de climats tempérés, appartenant à la famille des Apiacées (*Apiaceae*), anciennement appelée famille des Umbellifères. Cette vaste et complexe famille comprend environ 445 genres et 3 700 espèces (Downie et Katz-Downie, 1996). Les relations phylogénétiques établies anciennement sur la base de données morpho-anatomiques ont été plusieurs fois remaniées grâce à l'utilisation de nouveaux types de données issues de la biologie moléculaire (Le Clerc, 2001).

Au sein des Apiacées, la carotte est l'espèce qui revêt la plus grande importance économique, même si l'on y retrouve d'autres espèces cultivées comme le céleri (*Apium graveolens* L.), le fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.), le cerfeuil tubéreux (*Chaerophyllum bulbosum* L.), le panais (*Pastinaca sativa* L.), l'angélique (*Angelica archangelica* L.), la coriandre (*Coriandrum sativum* L.), le cumin (*Cuminum cyminum* L.), l'aneth (*Anethum graveolens* L.), le cerfeuil (*Anthriscus cerefolium* (L.) Hoffm.) et le persil (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) (Rubatzky *et al.*, 1999).

Le genre *Daucus* comprend 22 espèces, parmi lesquelles *Daucus carota* est la plus répandue (Reduron, 2007). *Daucus carota* est une espèce indigène, commune en Europe. On la trouve surtout dans des zones incultes, des prairies sèches au sol sableux ou caillouteux, du littoral jusqu'à 1 500 m d'altitude. L'aire de répartition de *D. carota* comprend les régions européennes, périméditerranéennes et se prolonge à l'Est jusqu'aux portes de l'Himalaya (Reduron, 2007).

La taxonomie de l'espèce *Daucus carota* est assez complexe, on distingue notamment deux sous-groupes infraspécifiques ou agrégats, construits sur la base de caractères morphologiques (Fig. 2) :

- *D. carota* subsp. agg. *carota*, regroupe des plantes à port élancé et dressé, elles sont maritimes ou situées à l'intérieur des terres.
- *D. carota* subsp. agg. *gummifer*, comprend des plantes à port trapu, aux feuilles plus épaisses, essentiellement présentes sur le littoral.



**Figure 2 :** Schéma global de l'organisation du complexe *Daucus carota* (d'après Small, 1978 in Reduron, 2007). L'isolement du sous-groupe F « gummifer » est particulièrement net. Dans le sous-groupe « carota », la séparation des carottes cultivées (A, B, C) et sauvages (D, E) apparaît bien. Au sein des cultivées, les carottes à racine orange (A) et les carottes orientales (C) sont reliées par un groupe intermédiaire (B).

L'agregat *gummifer* comprend sept sous-espèces, tandis que l'agregat *carota* en

comprend six dont la sous-espèce *sativus* regroupant l'ensemble des carottes cultivées (Reduron, 2007). Au sein de cette sous-espèce *sativus*, on distingue encore deux sous-ensembles ou variétés au sens botanique (Small, 1978 ; Reduron, 2007) :

- les carottes à anthocyanes ou carottes dites de l'Est (*D. carota* subsp. *sativus* var. *atrorubens*).
- les carottes à carotènes ou carottes dites de l'Ouest (*D. carota* subsp. *sativus* var. *sativus*).

### **1.1.3. Origine et histoire de la carotte cultivée**

#### **1.1.3.1. Une plante médicinale antique**

Tout comme de nombreuses Apiacées, les semences de carottes sont aromatiques et durant l'antiquité elles ont été utilisées comme épice ou plante médicinale (Simon *et al.*, 2008), ceci constitue vraisemblablement la première utilisation de la plante (Reduron, 2007). Chez les Grecs et les Romains, il a été rapporté la consommation d'Apiacées à racine blanches, mais il s'agirait en fait de panais (Rubatzky *et al.*, 1999).

#### **1.1.3.2. Domestication en Asie centrale**

Au contraire de la carotte sauvage européenne actuelle qui possède une racine très peu charnue, fibreuse et désagréable au goût (Reduron, 2007), les populations naturelles d'Afghanistan présentent des racines plus charnues, de couleur violet clair jusqu'à noir (présence d'anthocyanes). Le centre de diversification principal de l'espèce *Daucus carota* est donc situé en Afghanistan, au pied des montagnes de l'Himalaya et de l'Hindu Kush (Mackevic, 1929 ; Banga, 1963).

La domestication aurait consisté à sélectionner des plantes à racine plus charnue, moins fibreuse et moins ramifiée. La carotte jaune, souvent présente dans les mêmes régions que la carotte pourpre, est considérée comme une forme dérivée (mutants jaunâtres dépourvus d'anthocyanes) de celle-ci (Banga, 1963). La datation de la domestication reste imprécise, même si la présence de carottes cultivées pourpres ou jaunes est avérée en Perse (actuel Iran) au X<sup>e</sup> siècle (Laufer, 1919).

La zone de culture de la carotte cultivée s'est par la suite étendue vers l'Ouest jusqu'en Europe. On note ainsi la présence de carottes au Moyen-Orient et en Afrique du Nord au XI<sup>e</sup> siècle puis en Espagne au XII<sup>e</sup> siècle, en France, en Allemagne et aux Pays-Bas au XIV<sup>e</sup> siècle et en Angleterre au XV<sup>e</sup> siècle (Banga, 1963 ; Clotault, 2009).

#### **1.1.3.3. Un centre de diversification secondaire en Europe**

Les premières carottes cultivées en Europe possédaient de longues racines de couleur jaune ou pourpre. Les carottes violettes étaient populaires en raison de leur saveur douce mais « tachaient » les bouillons et les soupes, c'est pourquoi le type jaune fut rapidement préféré (Chaux et Foury, 1994 ; Simon *et al.*, 2008). Ce n'est qu'à la fin du XVII<sup>e</sup> siècle, que l'on

mentionne l'existence d'une variété de carotte blanche sans doute dérivée des types jaunes ou pourpres (Banga, 1963), confirmée par des analyses de la structuration de la diversité génétique (Clotault, 2009).

L'origine de la carotte orange est assez mal connue, mais les premières indications de l'existence de carottes oranges résident dans des tableaux de peintres flamands du XVII<sup>e</sup> siècle (Pitrat et Foury, 2003 ; Clotault, 2009). Banga (1963) considère que la carotte orange dériverait de la carotte jaune, sélectionnée à partir de carottes jaunes à taux de carotène élevé. Au fil des siècles, ce type de carotte a été sélectionné pour donner une racine de couleur de plus en plus foncée qui a finalement remplacé la carotte jaune.

#### **1.1.3.4. Une autre évolution en Asie du Sud-Est**

L'expansion de la carotte vers l'Asie du Sud-Est est moins documentée (Clotault, 2009) ; un type rose à rougeâtre serait apparu en Chine au XVIII<sup>e</sup> siècle. Des variétés orange occidentales auraient par la suite été introduites au Japon depuis l'Europe et les États-Unis. Cet apport a été suivi de nombreux croisements entre les carottes occidentales et les carottes orientales. Des cultivars japonais ont aussi directement été créés à partir de sélection de matériel occidental, par exemple le type 'Kuroda' (Takagi *et al.*, 2007).

#### **1.1.3.5. Le monopole de la carotte orange**

En Europe, la carotte pourpre, même si elle ne disparaît pas, connaît un déclin important après le XIX<sup>e</sup> siècle. La carotte jaune reste encore très utilisée au début du XIX<sup>e</sup> siècle puis est progressivement supplantée par la carotte orange. Ce succès de la carotte orange s'expliquerait par une teinte plus désirable, notamment après cuisson (Reduron, 2007). Presque toutes les variétés modernes actuelles dérivent de deux types de carottes oranges probablement apparus au XVII<sup>e</sup> siècle aux Pays-Bas : le type 'Long Orange', de gros calibre, et le type 'Horn', plus fin.

De nombreux cultivars orange sont apparus au fil du temps, avec en particulier une diversification des formes de racine. Bénéficiant d'une rapide et large diffusion, la carotte potagère s'est rapidement diversifiée en variétés locales répondant à des modes de culture et à des situations variées (Pitrat et Foury, 2003 ; Doré et Varoquaux, 2006).

## **1.2. Cycle de vie de la carotte cultivée**

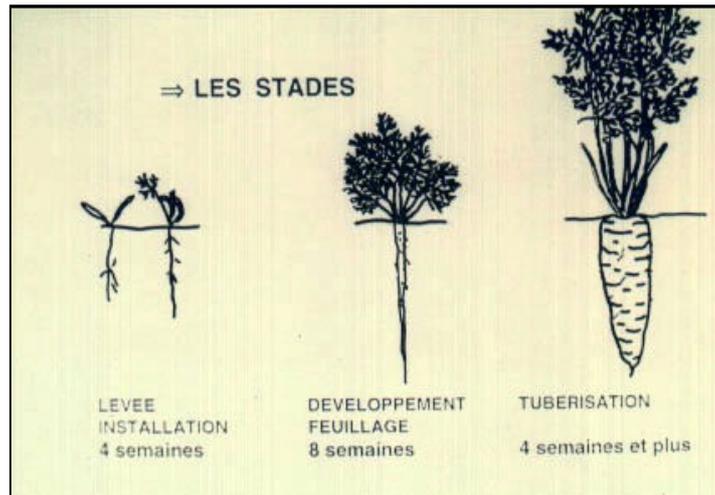
### ***1.2.1. Première année : le développement végétatif***

#### **1.2.1.1. Stades de développement**

Durant la première année qui suit la germination de la graine, le développement de la plante est strictement végétatif (feuilles, racine). Pour la carotte de consommation, la récolte s'effectue au cours de cette phase végétative (Péron, 2006), qui peut être découpée en trois

stades clés (Fig. 3) :

- levée et installation : c'est la phase correspondant à la sortie des cotylédons et des deux premières feuilles, ainsi qu'à la plongée dans le sol d'une fine racine primaire.
- développement du feuillage : les feuilles, disposées en rosette, assurent la migration des réserves vers la racine.
- tubérisation : au cours de cette phase, la croissance de la plante ne concerne pratiquement plus que la racine qui s'épaissit.



**Figure 3 :** Les stades de développement de la carotte (UNILET [Internet]).

La tubérisation commence par le haut de la racine et finit par la pointe. Elle ne s'opère que dans la partie supérieure de la racine et concerne une longueur bien définie, de 4-5 cm pour les carottes courtes à 25-30 cm pour les types longs (Chaux et Foury, 1994). On nomme « maturité biochimique » le stade où l'accumulation simultanée du carotène et des sucres solubles est maximale. La maturité biochimique correspond également au moment où l'extension diamétrale de la racine est à son maximum (Phan et Hsu, 1973).

#### 1.2.1.2. La racine, partie consommée de la carotte

La partie consommée correspond à la racine de la plante, récoltée au cours ou à l'issue de la phase végétative. Elle présente une partie centrale (xylème) et une partie extérieure charnue (phloème). L'intérêt alimentaire de cette racine porte sur son goût, sa couleur, mais aussi ses caractéristiques nutritionnelles (Aubert et Bonnet, 1977 ; Tirilly et Bourgeois, 1999).

De nombreux composés peuvent interagir dans la perception du goût. Parmi ceux-ci, les sucres (saccharose, glucose, fructose), les terpénoïdes qui contribuent à l'âpreté (goût typique de la carotte) et les polyphénols sont les plus influents sur la perception de la saveur (Alasalvar *et al.*, 2001 ; Le Clerc, 2001).

La carotte orange est le type largement dominant dans nos habitudes de consommation, mais d'autres couleurs existent. Ces différences de couleur s'expliquent toutes par des différences de teneur en caroténoïdes, hormis la carotte pourpre dont la couleur est due à la

présence d'anthocyanes. Les carottes blanches quant-à-elles, n'accumulent pas de pigments (Clotault *et al.*, 2008 ; Clotault, 2009).

Le type orange est généralement le plus riche en caroténoïdes totaux (~15 mg/100 g de Matière Fraîche (MF)). Les carottes roses et jaunes possèdent respectivement des teneurs en caroténoïdes totaux de ~10 mg/100 g MF et ~0,7 mg/100 g MF. Les types pourpres originels auraient un profil de caroténoïdes similaire à celui du type jaune (Nicolle *et al.*, 2004 ; Clotault, 2009). Les deux caroténoïdes majoritaires chez la carotte orange sont le  $\beta$ -carotène (3-13 mg/100 g MF) et l' $\alpha$ -carotène (1,2-7,5 mg/100 g MF). La lutéine est aussi présente mais en plus faible quantité (0,3-1 mg/100 g MF) (Nicolle *et al.*, 2004 ; Clotault, 2009).

De plus en plus d'intérêt est porté aux composés nutraceutiques de la racine, c'est-à-dire aux composés pouvant être bénéfiques pour la santé. Ainsi la carotte représente un aliment intéressant pour sa teneur en composés antioxydants, principalement les anthocyanes ou l'acide chlorogénique mais aussi les caroténoïdes (Sun *et al.*, 2009). La forte teneur en caroténoïdes, notamment le  $\beta$ -carotène, est très intéressante, car ce  $\beta$ -carotène ou provitamine A, sera transformée par le métabolisme humain en vitamine A.

### ***1.2.2. Deuxième année : la phase reproductive***

La seconde année de son développement, après avoir subi les basses températures de l'hiver (vernalisation), la plante utilise les réserves de sa racine tubérisée pour former une hampe florale constituée de plusieurs ramifications (Villeneuve et Leteinturier, 1992a).

Après la vernalisation, permettant l'induction florale, la plante atteint le stade montaison qui bloque totalement la croissance en épaisseur de la racine et permet le développement d'une tige florifère. La durée de cette vernalisation est très variable selon les cultivars (Reduron, 2007). L'initiation de la montaison est obtenue après 40 à 60 jours de températures inférieures à 10 °C (Villeneuve et Leteinturier, 1992a).

La floraison est estivale ; la durée de cette floraison est de 7 à 10 jours pour une ombelle donnée, mais de 30 à 50 jours pour la plante entière (Rubatzky *et al.*, 1999). La fécondation est entomophile et elle est liée à une attractivité chimique prépondérante (composés volatils). Elle permet un fort niveau d'allogamie (Le Clerc, 2001) et elle est corrélée avec une forte vigueur hybride (hétérosis) (Rubatzky *et al.*, 1999). L'allogamie est aussi renforcée par un caractère protandre marqué : la séparation des phases mâles et femelle est complète sur la fleur et sur l'ombelle (Reduron, 2007). Cependant, les deux phases se recouvrent sur la plante entière autorisant une géitonogamie<sup>2</sup> (Koul *et al.*, 1989). La floraison des ombelles est échelonnée dans le temps. Enfin il existe, chez la carotte, des phénomènes d'autoincompatibilité partielle. De plus, les semences autopollinisées sont de moindre qualité (Rubatzky *et al.*, 1999). En conséquence, s'il est possible de réaliser des autofécondations, il est bien plus difficile d'obtenir des lignées pures au sens strict du terme.

L'interfécondité entre les carottes sauvages (var. *carota*) et cultivées (subsp. *sativus*) a été maintes fois constatée ; elle est suffisamment effective pour rendre délicate la production de semences de carotte à proximité de populations sauvages (Reduron, 2007).

Une plante produit entre 1 000 et 40 000 semences ; la complète maturation des semences intervient 44 jours au moins après la floraison, 50 à 55 jours après la première fleur (Reduron, 2007). La durée de conservation des semences est de quatre ans (Tirilly et Bourgeois, 1999). Ces semences peuvent présenter une forte dormance ; la levée de dormance exige un minimum de 3 mois après le stade « fruit sec », les semences des plantes sauvages sont plus dormantes que celles des variétés cultivées (Reduron, 2007).

## **1.3. Culture et production**

### ***1.3.1. Exigences pédoclimatiques***

Le climat océanique doux et humide est favorable à une bonne croissance de la carotte et une tubérisation de sa racine. Les basses températures sont préjudiciables à la formation du carotène et donc à une coloration correcte de la racine (phénomène souvent observé en culture de primeur). Après tubérisation, la racine résiste à des températures de -3 °C à -4 °C. Les températures optimales de croissance sont comprises entre 16 et 18 °C (Péron, 2006).

La carotte nécessite, pour former des racines longues, droites et de belle qualité, des sols profonds et meubles, fertiles, doués d'une bonne capacité de rétention en eau et exempts de pierres ou de mottes pouvant entraîner la déformation de la racine. Les sols légers, frais, sableux à sablo-limoneux, profonds, non battants et bien drainants sont les plus favorables à une production de carotte de qualité. Le pH optimal se situe à 6,5 (Péron, 2006).

La carotte craint les excès d'eau en hiver qui peuvent entraîner des disparitions de plants par pourritures racinaires. Elle est également sensible à la salinité, au déséquilibre calcium-magnésium et à la présence de matière organique fraîche (Péron, 2006).

### ***1.3.2. Diversité des productions***

Il existe une segmentation du marché de la carotte en fonction de la destination des racines produites. On distingue classiquement la carotte pour la vente en frais (primeur, de saison ou de garde) et la carotte d'industrie destinée en majeure partie à la conserve appertisée (petites carottes pour mélange pois-carotte, grosses carottes pour macédoine de légumes), avec une part croissante du surgelé (purées, rondelles, jardinières de légumes) (Villeneuve et Leteinturier, 1992b ; Péron, 2006 ; UNILET [Internet]).

---

<sup>2</sup> Pollinisation d'une fleur avec le pollen d'une autre fleur provenant de la même plante.

Une portion anecdotique de la production de carotte est utilisée en fourrage pour l'alimentation animale, il s'agit typiquement de grosses carotte jaunes ou blanches telles que 'Jaunes obtuse du Doubs' ou 'Blanche à collet très hors de terre' (Villeneuve et Leteinturier, 1992b). À cette diversité des produits correspond une diversité des itinéraires techniques (semis, récolte) et des types variétaux employés.

### 1.3.3. Itinéraire phytotechnique

En Europe occidentale, les semis s'effectuent d'octobre-novembre à janvier-février pour la carotte de primeur sous abris, de mars à juin-juillet pour la carotte de saison et de mi-mars à mi-avril pour la petite carotte d'industrie (Péron, 2006). La carotte est semée à forte densité : 1,8 million de graines/ha pour les carottes à destination du marché de frais, 2,5 million/ha pour les petites carottes et 1 million/ha pour les grosses carottes (Villeneuve et Leteinturier, 1992b ; Rubatzky *et al.*, 1999). Il existe un lien très fort entre la densité à la récolte et le calibre des racines (Villeneuve et Leteinturier, 1992b).

La durée du cycle de production est de 85 à 115 jours pour la jeune carotte, de 180 à 210 jours pour les grosses carottes (semis en avril-mai), voire 250 dans les zones non gélives où elles passent une partie de l'hiver au champ (UNILET [Internet]).

Lors de la culture, une fumure minérale est recommandée mais ne doit pas être excessive au risque d'obtenir un développement important du feuillage au détriment des racines (Villeneuve et Leteinturier, 1992a).



**Figure 4 :** Récolte de carotte par préhension du feuillage. Photographie prise lors de la 32<sup>nd</sup> International Carrot Conference, Arcachon, France, septembre 2007 (cliché personnel).

Les récoltes s'étalent aussi sur toute l'année, elles débutent début mai pour la carotte

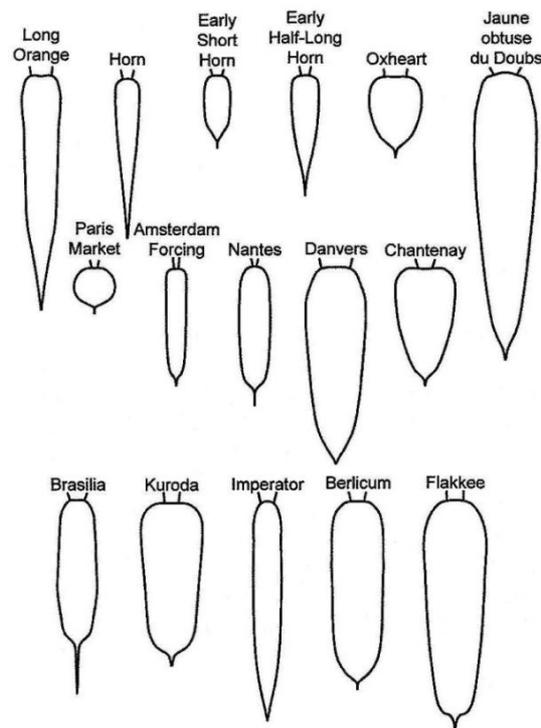
primeur. Pour les carottes de saison (marché de frais et transformation), elles ont lieu de mai-juin à mai de l'année suivante, selon les régions (Péron, 2006). En régions non gélives, l'arrachage se fait au fur et à mesure des besoins (conservation hivernale au champ). Ailleurs, l'arrachage est réalisé à maturité et les racines sont stockées en chambre froide.

Deux types de machines sont utilisés pour la récolte (Villeneuve et Leteinturier, 1992b ; Péron, 2006) : (i) des machines opérant par préhension du feuillage (Fig.4), cette technique abîme moins les racines et permet donc une meilleure conservation (Chaux et Foury, 1994), elle est donc préférentiellement utilisée pour le marché de frais, (ii) des machines opérant par soulèvement des racines, utilisées pour la récolte des grosses carottes d'industrie.

Les rendements en t/ha se situent autour de 40 à 60 pour la carotte primeur, de 40 à 70 pour la carotte de plein champ pour la vente en frais, et de 30 à 40 pour la petite carotte de transformation (Péron, 2006).

### 1.3.4. Diversité des types cultivés

L'évolution des cultivars de carotte en Europe a été continue pendant 400 ans durant lesquels plusieurs centaines de variétés locales et plus largement de variétés-populations ont été sélectionnées. La diversification variétale du type orange a abouti à une variabilité importante pour la forme (Fig. 5), l'aptitude à la culture et la précocité puis plus tard la coloration. Quarante variétés sont ainsi connues en 1925 en France (Pitrat et Foury, 2003).



**Figure 5 :** Formes typiques de la racine de carotte. La première ligne correspond aux types européens originaux, les deux dernières correspondent aux principaux types cultivés dans le monde actuellement (Simon et al., 2008).

Les progrès des techniques culturales et les exigences commerciales des années 1950 ont généré un besoin d'uniformisation. Les sélectionneurs y ont répondu par la création d'hybrides. Ces hybrides F1 ont abouti à des variétés plus homogènes, plus précoces, plus résistantes aux pathogènes et au rendement plus élevé (Pitrat et Foury, 2003). Les premiers hybrides ('Tancar' et 'Nandor') ont été inscrits au catalogue officiel des variétés en 1977. En 1999, 93% des variétés d'obteneurs étaient des hybrides, beaucoup plus homogènes que les variétés-populations jusqu'alors cultivées.

Les hybrides de type 'Nantes' sont aujourd'hui cultivés toute l'année et représentent la majorité des types de carotte utilisés pour le marché de frais en Europe (Simon *et al.*, 2008). D'autres types européens restent utilisés, dans une moindre mesure : 'Chantenay', 'Danvers', 'Paris Market', 'Flakkee', 'Berlicum' et 'Amsterdam' (Simon *et al.*, 2008). Le type 'Amsterdam' est également vendu en bottes pour le marché de frais mais surtout en tant que carotte d'industrie pour les mélanges pois-carotte.

Bien que dominant, le type 'Nantes' n'est pas le seul cultivé à grande échelle au niveau mondial. En effet, les formes de carotte les plus appréciées varient d'un continent à un autre. Ainsi, pour le marché de frais, le consommateur français est surtout demandeur du type 'Nantes'. Le type 'Imperator' est quant à lui, le principal type de production en frais aux États-Unis et en Australie. On retrouve à cette même position le type 'Kuroda' en Asie. Le type 'Brasília', issu d'une combinaison de fonds génétiques variés, est spécifique de l'Amérique du Sud (Simon *et al.*, 2008).

Tous ces types dérivent de types européens ancestraux (cf. § 1.1.3.5. Le monopole de la carotte orange). Au Brésil, avant le développement de cultivars adaptés aux conditions tropicales et subtropicales, la culture de la carotte était restreinte au sud du pays car les conditions environnementales et climatiques induisaient souvent la floraison des plantes (le cycle devenant annuel). À la fin des années 1950, le premier programme de sélection brésilienne a été initié avec comme objectif principal une adaptation de cette culture aux conditions brésiliennes avec un focus sur la résistance à l'alternariose (Simon *et al.*, 2008). Le type 'Brasilia' actuel est né de ces travaux.

Afin de conserver cette diversité, des collections de ressources génétiques se sont mises en place dans plusieurs pays comme la France, les États-Unis, le Royaume-Uni, l'Allemagne, le Brésil ou la Corée (Simon *et al.*, 2008). La sauvegarde des accessions françaises s'est organisée depuis 1996 sous la forme du réseau de ressources génétiques « Carotte et autres *Daucus* », coordonné par Agrocampus-Ouest – Centre d'Angers (Briard *et al.*, 2007 ; Geoffriau, com. pers.).

## 1.4. Importance économique

### 1.4.1. Contexte mondial

La culture de la carotte s'est développée dans toutes les zones tempérées du globe, et particulièrement en Europe, où sa production bénéficie de conditions favorables. La carotte est cultivée jusque dans les zones subtropicales, durant la saison fraîche (Chaux et Foury, 1994). D'un point de vue économique, la carotte fait partie des dix cultures légumières les plus importantes dans le monde, en termes de surface de production et de valeur marchande (Simon *et al.*, 2008).

La carotte, par sa valeur nutritionnelle, ses modes de consommation simples et variés, ainsi que par son prix modéré, est le légume racine le plus consommé dans le monde (Chaux et Foury, 1994). Sa production mondiale est en constante progression et atteint, pour l'année 2010, les 33,7 millions de tonnes<sup>3</sup> sur une superficie d'environ 1,2 millions d'hectares à travers le monde (FAOSTAT [Internet]). L'Union Européenne (UE) (5,2 million de tonnes) est le deuxième producteur mondial après la Chine. Cinq pays (Chine, États-Unis, Russie, Ouzbékistan et Pologne) produisent 60 % du volume mondial, la France étant à la 11<sup>e</sup> position avec 525 000 t sur 12 810 ha (FAOSTAT [Internet] ; FranceAgriMer [Internet]).

Par ailleurs la France est, avec les États-Unis, l'un des deux plus importants pays producteurs de semences de carotte. En 2011, 2 853 ha y étaient consacrés pour la production de semences (Gnis [Internet]). Dans les années 2000, le commerce des semences de carotte au niveau mondial représentait une valeur d'environ 100 millions de dollars (Simon *et al.*, 2008).

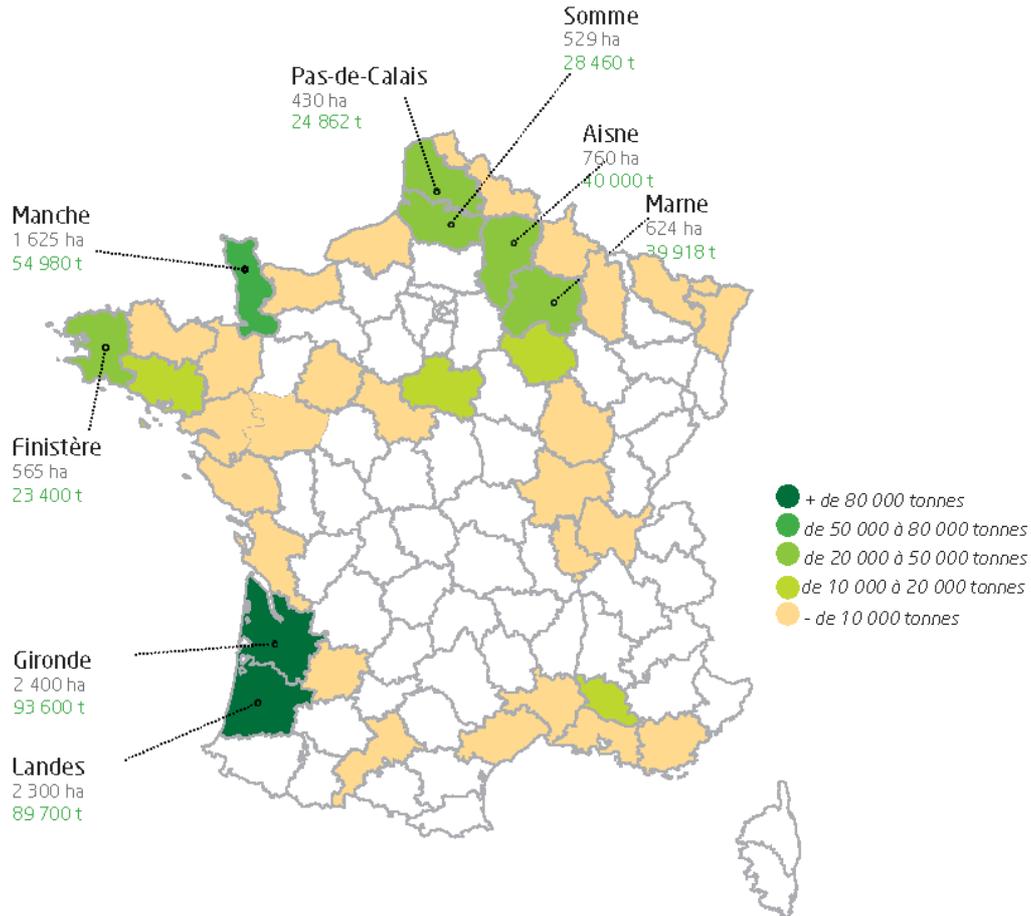
### 1.4.2. Contexte national

En France, la carotte est cultivée sur tout le territoire, dans le jardin familial, en maraichage ainsi qu'en cultures intensives de plein champ. L'essentiel des cultures se trouve concentré sur un nombre limité de bassins (Fig. 6).

Le bassin majeur de production est la région Aquitaine en particulier pour la carotte primeur (FranceAgriMer [Internet]). Le reste de la production nationale se situe essentiellement en Picardie, en Basse-Normandie, en Champagne-Ardenne, en Bretagne et dans le Nord-Pas-de-Calais.

Les volumes destinés à l'industrie de transformation se concentrent pour la majorité en Picardie (100 % de la récolte régionale), en Champagne-Ardenne, en Bretagne et dans le Nord-Pas-de-Calais. Les régions du sud de la France qui produisent des volumes bien moindre, consacrent leur production au marché du frais. En 2010, la carotte d'industrie représentait 2 870 ha pour 196 700 t, soit 22,4 % de la surface et 37,5 % du tonnage national (Agreste [Internet] ; FranceAgriMer [Internet]).

<sup>3</sup> Valeurs données pour 'Carottes et navets' par la FAO



**Figure 6 :** Répartition de la production française en 2010 (FranceAgriMer [Internet]).

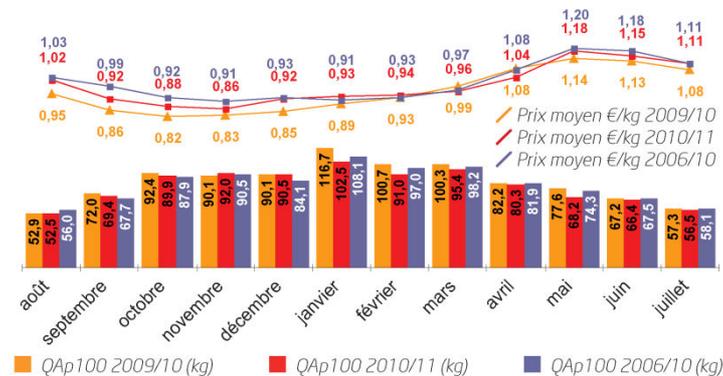
Le nombre d'hectares ensemencés avec des carottes est en baisse depuis 2006 (Tab. I). Malgré cette diminution régulière des surfaces cultivées en carotte, on observe une fluctuation interannuelle des tonnages récoltés qui peut être importante. Les facteurs influençant le niveau de la production nationale sont principalement d'ordre climatique (pluviométrie estivale et rigueur hivernale) (Chaux et Foury, 1994).

**Tableau I :** Évolution des prix, de la surface et du volume récolté en France entre 2006 et 2010 (FranceAgriMer [Internet] ; Insee [Internet]).

	2006	2007	2008	2009	2010
Indice des prix à la production (base 100 en 2000)	134,8	142,4	145,4	115,4	121,2
Surface récoltée (en ha)	14 003	13 191	13 323	13 157	12 810
Volume récolté (en t)	624 864	589 690	556 517	565 330	525 358

La consommation annuelle française en équivalent frais est estimée à 11,1 kg par ménage. Pour comparaison, la carotte est n° 3 après les pommes de terre (30 kg) et les tomates (13 kg). La salade (7 kg) et les endives (6,7 kg) viennent immédiatement après. En

2010, les carottes fraîches pèsent pour 12 % dans les achats en volume de légumes des ménages français pour leur consommation à domicile (FranceAgriMer [Internet]).



**Figure 7 :** Quantités achetées et prix moyen d'achat des carottes en France pour la campagne 2010/2011. QAp100 : quantités achetées pour 100 ménages (FranceAgriMer [Internet]).

Pour le consommateur, le prix moyen d'achat des carottes était de 0,98 €/kg pendant la campagne 2010/2011 (FranceAgriMer [Internet]). Bien que disponible toute l'année, il existe une saisonnalité dans le prix d'achat des carottes (Fig. 7). La part du bio dans les achats de carottes fraîches atteint désormais 6,7 % pour la campagne 2010/2011.

En Europe, 80 % de la production de carotte est destiné au marché de frais et 20 % réservé à la transformation (conserves ou surgelés).

### 1.4.3. Contexte régional

La région Pays de la Loire regroupe la majorité des recherches conduites en France pour l'obtention de variétés de carotte résistantes aux bioagresseurs. De fait, la région abrite entre autres les établissements Vilmorin et HM-Clause, très actifs dans le domaine de la création variétale chez la carotte. Elle héberge également les activités du GEVES (Groupe d'Étude et de contrôle des Variétés Et des Semences) sur l'évaluation des nouvelles variétés de carotte inscrites au catalogue français, et le centre technique de la FNAMS (Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences), impliqué dans les recherches sur la carotte porte-graines. Enfin, deux équipes angevines de recherche publique sont très investies dans le domaine de la carotte ; leurs activités sont complémentaires : l'équipe 'FungiSem' de l'UMR IRHS (Institut de Recherche en Horticulture et Semences) mène des recherches concernant les champignons pathogènes transmis par les semences, et en particulier les espèces du genre *Alternaria* (*A. brassicicola*, *A. dauci*) ; l'équipe 'QuaRVeg' de l'UMR IRHS s'intéresse quant à elle au déterminisme génétique et à la caractérisation fonctionnelle de la résistance de la carotte à *A. dauci*, ainsi qu'à la caractérisation de la diversité des caroténoïdes.

## 1.5. Sélection variétale

### 1.5.1. Objectifs de la sélection

Les objectifs de la création variétale chez les espèces maraichères peuvent être répartis en trois groupes (Tirilly et Bourgeois, 1999) : (i) la qualité (apparence visuelle du produit, qualités technologiques liées à l'utilisation du produit dans les industries de transformation, valeurs nutritionnelles et arômes, diminution de la teneur en substances désagréables ou potentiellement nocives), (ii) la résistance aux maladies et ravageurs, (iii) l'adaptation aux conditions de production, de distribution et de consommation.

La résistance aux maladies nous concerne plus particulièrement au cours de ces travaux de thèse. Cette résistance est une caractéristique héritable qui permet de diminuer l'incidence d'une maladie dans une culture. Les résistances sont caractérisées par trois critères : leur niveau, leur stabilité et leur contrôle génétique (Tirilly et Bourgeois, 1999).

- le niveau de résistance : une résistance totale peut permettre un contrôle complet de la maladie par opposition à une résistance partielle qui va seulement limiter le développement de l'épidémie ou réduire l'intensité des symptômes, mais nécessiter le plus souvent des traitements phytosanitaires complémentaires ;
- la stabilité de la résistance : elle est liée à la diversité de l'agent pathogène. Une résistance générale contrôlera toutes les souches d'un agent pathogène alors qu'une plante possédant une résistance spécifique d'une race pourra être sensible à d'autres races ;
- le contrôle génétique : ce caractère n'a pas d'intérêt direct pour le producteur mais est très important pour le sélectionneur. Il est en effet plus facile d'introduire dans une variété, une résistance contrôlée par un gène majeur qu'une résistance contrôlée par plusieurs gènes à effets partiels. La conséquence pratique est que, si le contrôle génétique est complexe, il y aura moins de variétés résistantes disponibles.

### 1.5.2. Sélection appliquée à la carotte

La sélection massale a, dans un premier temps, été la façon la plus courante d'améliorer les populations de carotte. La plupart des variétés-populations ont été obtenues à partir de variétés préexistantes, en exerçant la sélection sur un ou plusieurs caractères. Ces variétés génétiquement hétérogènes ont permis aux sélectionneurs d'obtenir un grand nombre de cultivars, présentant des caractères propres tant au regard des aptitudes culturales que de la morphologie des racines. Des variétés-populations à fort rendement et de très bonne qualité ont pu être obtenues, mais malgré tous les efforts pour obtenir des variétés-populations avec un haut niveau d'uniformité, les résultats ont été limités (Le Clerc, 2001).

La couleur, et indirectement la teneur en caroténoïdes, représente l'un des principaux caractères sélectionnés au cours de l'histoire de la carotte cultivée (Clotault, 2009). Très rapidement, la longueur des racines a été également privilégiée puisqu'elle représente le

principal facteur de production chez la carotte. De même, afin de maintenir des rendements élevés, la forme des racines évolue pour passer du conique au cylindrique, aboutissant à une meilleure productivité des variétés (Le Clerc, 2001).

La création d'hybrides, facilitée par la découverte de stérilités mâle nucléocytoplasmiques, a permis d'obtenir une meilleure vigueur et une uniformité des plantes. Ces stérilités mâles introduites par l'INRA dans les années 1960, sont de deux types. La stérilité mâle du type « anthères brunes » (découverte par Welch et Grimball en 1947) est actuellement la plus utilisée en Europe, en particulier chez la plupart des hybrides 'Nantaise' (Doré et Varoquaux, 2006). Les anthères restent rudimentaires, elles sont recroquevillées et les cellules-mères des grains de pollen ne dépassent pas le stade tétrade. Le type « étamines pétaloïdes » (découvert par Munger en 1953 chez une carotte sauvage) est actuellement utilisée aux États-Unis dans presque 100 % des variétés hybrides (Doré et Varoquaux, 2006). Dans ce cas, les étamines sont transformées en pièces pétaloïdes de couleur verte.

En revanche, pour le semencier, ces hybrides posent problème notamment en termes de production de semences. En effet, la carotte étant allogame, la dépression de consanguinité se fait rapidement sentir après seulement quelques générations d'autofécondations conduisant ainsi à une perte de vigueur des lignées. La faible vigueur des lignées utilisées entraîne alors un rendement en graines peu élevé. Afin de remédier à ce problème, les sélectionneurs ont développé des hybrides trois voies obtenus à partir d'hybrides F1 utilisés comme parent femelle, profitant ainsi de l'effet d'hétérosis, et d'une lignée servant de parent mâle.

### ***1.5.3. Caractères travaillés en création variétale chez la carotte***

Les caractères importants qui ont été améliorés chez la carotte, ou qui devraient l'être, concernent (Doré et Varoquaux, 2006 ; Simon *et al.*, 2008) :

- la forme de la racine. Elle est liée au marché (Europe/Amérique/Japon) et au type de production (pour le frais, pour la transformation) ;
- le rendement. La production de culture commercialisable est la première priorité pour les producteurs et en conséquence pour les sélectionneurs. Il est dépendant du type et du marché de destination visé (frais, d'industrie, ...) ;
- la qualité mécanique. Il s'agit de la résistance aux manipulations et au transport ; les racines ne doivent pas se casser lors de la récolte ou du transport ;
- l'aptitude à la mécanisation. Les variétés hybrides ont apporté une meilleure homogénéité qui s'est accompagnée d'une amélioration de la qualité de la semence (calibrage notamment). Ceci a permis l'emploi de semoirs pneumatiques. La mécanisation de la récolte représente un facteur agronomique important. L'arrachage mécanique s'effectuant par préhension des fanes, la taille et la forme du feuillage est important, le feuillage doit être solide avec un port dressé pour permettre de soulever la racine. Inversement, un feuillage excessif peut également être problématique car celui-ci conserve une forte humidité alors favorable au développement de maladies ;

- la qualité visuelle. Le consommateur recherche une carotte avec un épiderme lisse et brillant après le lavage, d'une coloration orange vif, de forme régulière, sans meurtrissures ni crevasses. L'absence de collet vert et un cylindre central réduit sont également considérés comme un signe de bonne qualité ;
- la qualité gustative et nutritionnelle. La qualité organoleptique est notamment liée à la teneur en sucres. Par ailleurs, les premières variétés de carotte cultivées contenaient un taux élevé en terpénoïdes volatils donnant une saveur désagréable. Une contre-sélection a été effectuée, les populations ainsi que les hybrides de type 'Nantes' actuels en contiennent peu. La qualité nutritionnelle, conférée entre autre par la provitamine A, a reçu l'attention des sélectionneurs depuis les années 1960. Aux USA, cette sélection a permis d'augmenter de 70 % la teneur en provitamine A des carottes entre 1970 et 1992 (Simon *et al.*, 2008) ;
- la résistance à la montée à graines. Elle permet de réaliser un semis d'automne pour une récolte précoce au printemps. On cherche en effet, les variétés ayant une montaison la plus tardive possible afin d'exploiter pleinement son caractère de plante bisannuelle. Une forte incidence de floraison précoce est observée lorsque des cultivars d'origine subtropicale sont cultivés dans des zones à climat tempéré ;
- l'aptitude à une récolte tardive en hiver. Pour les carottes de garde restant au champ, les plantes doivent être vigoureuses avec un feuillage et une racine résistant aux basses températures ;
- la production de semences. En plus des exigences des producteurs et des consommateurs, les sélectionneurs doivent obtenir des parents ayant un rendement en semences satisfaisant d'un point de vue économique ;
- la diversification des systèmes de stérilités mâles nucléo-cytoplasmiques. L'utilisation, à grande échelle en Europe, d'un seul cytoplasme pourrait révéler une sensibilité à certains bio-agresseurs ou à certaines conditions pédoclimatiques. La recherche dans les populations anciennes de nouveaux cytoplasmes mâles stériles doit donc être activement poursuivie ;
- la résistance aux ravageurs et maladies. C'est actuellement l'un des caractères les plus travaillés. En effet, la résistance face aux pathogènes devient indispensable du fait de la disponibilité réduite de nombreux produits phytosanitaires, du souci grandissant de respect de l'environnement et de la santé humaine, mais également pour diminuer les pertes de rendements et maintenir la qualité générale.

## **1.6. Maladies et ravageurs de la carotte**

### ***1.6.1. Les maladies racinaires***

#### **1.6.1.1. Fontes de semis**

Les fontes de semis se traduisent par des manques à la levée d'autant plus graves lorsque

les conditions climatiques et la préparation du lit de semences s'opposent à une levée rapide. Cela explique qu'elles soient relativement courantes sur les semis précoces de printemps. Elles peuvent être dues à des champignons transmis par la semence (*Alternaria dauci*, *Alternaria radicina*) ou présents dans le sol (*Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*). Le traitement des semences demeure le seul moyen de lutte (Villeneuve et Leteinturier, 1992b).

#### 1.6.1.2. Maladies de conservation

Les maladies de conservation de la carotte font généralement suite à une contamination au champ. Quelques-unes peuvent cependant attaquer les racines saines au cours du stockage. À ce stade, la lutte chimique n'est plus possible.

- Cavity spot. Le Cavity spot ou maladie de la tache, dégrade l'épiderme des racines et conduit à la formation de taches en dépression. Cette maladie affecte peu le rendement mais déprécie gravement la qualité visuelle des racines et offre une voie d'entrée à d'autres agents pathogènes. La maladie de la tache est due à des attaques de *Pythium* spp. ; *P. violae* est le principal agent incriminé, mais six autres espèces pathogènes sur carotte ont été recensées en France (Villeneuve et Leteinturier, 1992a ; Péron, 2006).

- Maladie de la bague. Cette maladie, due au champignon *Phytophthora megasperma*, s'observe essentiellement sur les grosses carottes et les 'Nantaises' récoltées tardivement, à l'automne ou au début de l'hiver. Une tache vitreuse apparaît sur la racine et s'étend de manière transversale pour former un anneau de couleur brun-noir (= bague). Cette zone malade constitue une porte d'entrée pour d'autres bactéries et champignons, qui entraînent alors une pourriture de la racine. Les contaminations ont souvent lieu durant l'automne, et les lésions s'étendent durant l'hiver car ce champignon est actif dès 8-10 °C (Péron, 2006 ; UNILET [Internet]).

- Rhizoctone violet. Cette maladie concerne essentiellement les grosses carottes, en fin de saison. Un feutrage velouté, pourpre ou bleuâtre, forme un manchon sur une partie de la racine. Le champignon responsable, *Rhizoctonia violacea*, colonise le sol sur une grande profondeur et sa persistance est très longue (20 ans) (Péron, 2006 ; UNILET [Internet]).

- Sclérotiniose. La sclérotiniose ou pourriture blanche débute son infection au niveau du collet et de la base des pétioles, et s'étend aux feuilles. Un abondant mycélium blanc et cotonneux se développe, sur lequel se forment des sclérotés blancs puis noirs. Il arrive aussi que les racines infectées ne présentent pas de symptômes à la récolte, mais que la maladie se développe en cours de stockage. Le champignon responsable est *Sclerotinia sclerotiorum*. Il est très polyphage et s'attaque à de nombreuses cultures légumières (céleri, laitue, haricot, pois, chou...) ou non (oléo-protéagineux).

- *Alternaria radicina*. Ce champignon provoque des symptômes présents au champ mais peu marqués, qui évoluent en cours de stockage et dégradent la qualité des racines. Ce champignon provoque également des symptômes au niveau du collet et parfois au niveau du feuillage.

- *Mycocentrospora acerina*. La contamination a généralement lieu au moment de la récolte. Le champignon pénètre par le haut ou le bas de la racine et se développe au niveau du cœur. Les tissus attaqués deviennent noirs, humides et mous.
- *Botrytis cinerea*. Les attaques se manifestent par une pourriture molle et brune, recouverte d'un mycélium gris.
- Pourritures racinaires diverses. De nombreux pathogènes dits « de faiblesse » sont responsables de maladies secondaires évoluant généralement en pourriture. Ils s'installent sur les zones de rupture de l'épiderme des racines ou sur de précédentes attaques de champignons, bactéries ou ravageurs. Ces pathogènes peuvent être des champignons (*Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Botrytis* spp., etc.) ou des bactéries pectinolytiques comme *Erwinia carotovora*.

## 1.6.2. Les maladies foliaires

### 1.6.2.1. Brûlures foliaires

Les producteurs de carottes de consommation ou de carottes porte-graines doivent régulièrement faire face à des épidémies de brûlures foliaires qui peuvent décimer partiellement voire totalement leurs cultures. Ces brûlures foliaires sont imputées à plusieurs parasites dont les symptômes sont difficilement différenciables. Le terme brûlures foliaires regroupe deux champignons (*Alternaria dauci* et *Cercospora carotae*) et une bactérie (*Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*). Le principal agent pathogène responsable des brûlures foliaires est le champignon nécrotrophe *Alternaria dauci* (Chaux et Foury, 1994).

Alternariose. Cette maladie, provoquée par *Alternaria dauci*, très importante et très répandue, peut causer une perte totale du feuillage dans le Sud de la France en production d'automne-hiver. La partie 2. de ce chapitre 'Synthèse bibliographique' sera consacrée à cet agent pathogène.

Cercosporiose. *Cercospora carotae* provoque des taches circulaires ou semi-circulaires souvent situées au bord de la foliole. Ces taches sont claires au centre et elles deviennent noires à la périphérie, puis grisâtres lorsque le champignon fructifie. Les pétioles, les tiges et les ombelles peuvent être attaqués. La maladie se transmet par les semences et les résidus de culture (Villeneuve et Leteinturier, 1992a). *Cercospora carotae* est le plus commun au Canada où il attaque les jeunes plantes et est trouvé plus tôt dans la saison qu'*A. dauci* (Pickle, 2009).

### 1.6.2.2. Autres maladies

Mildiou. Maladie provoquée par *Plasmopara nivea*. La face supérieure des feuilles de carotte porte des taches jaunâtres tandis que la face inférieure est recouverte d'un dense feutrage blanc, constitué des conidies du champignon. La dissémination est très rapide.

Oïdium. Provoqué par *Erysiphe heraclei* (syn. *E. umbelliferarum*), les symptômes se manifestent sous forme de taches poudreuses d'aspect blanc sur les deux faces des feuilles et sur ombelles (Messiaen *et al.*, 1991).

**Septoriose.** Les pycnides du champignon *Septoria carotae* apparaissent disséminées sur le feuillage encore vert de la carotte, avant de provoquer son jaunissement puis son dessèchement. Les ombelles peuvent être envahies et la septoriose est alors transmise par les semences.

*Diaporthe angelicae* / *Phomopsis* spp. Quelques cas d'attaques provoquées par ce champignon ont été rapportés récemment (Poupard, com. pers.).

### **1.6.2.3. Viroses**

Plusieurs virus peuvent s'attaquer à la carotte mais les dégâts sont rares sur les cultures d'industrie. Les virus les plus fréquents sont le *Carrot Red Leaf Virus* et le *Motley Dwarf Virus*, transmis par le puceron de la carotte et responsable du nanisme bigarré.

## **1.6.3. Les ravageurs**

### **1.6.3.1. La mouche de la carotte**

*Psila rosae* est le principal ravageur des cultures de carottes d'industrie. Elle est présente dans tous les bassins de production, mais le nombre de vols diffère suivant les zones. Attirées par la culture, les femelles viennent pondre sur le sol, à proximité des collets. Après une incubation de 7 à 15 jours, les larves éclosent, se nourrissent des radicelles puis pénètrent dans les racines. Les conséquences sont variables selon le stade des carottes. Sur les jeunes plantes, on constate des arrêts de croissance et des déformations de racines. L'affaiblissement peut même aboutir à la disparition de plantes. Sur les cultures en cours de tubérisation, il y a formation de galeries superficielles qui favorisent l'apparition de pourritures secondaires.

### **1.6.3.2. Pucerons de la carotte**

Plusieurs espèces de pucerons (*Cavariella aegopodii*, *Semiaphis dauci*, *Aphis lambersi*, *Myzus persicae*) peuvent se rencontrer sur carotte (Hullé, 1999). Le puceron de la carotte, *C. aegopodii*, est cependant le plus courant. Il est spécifique de cette culture. Son vol débute fin avril et se poursuit jusque fin juin. Les dégâts sur jeunes cultures sont les plus dommageables : décoloration et crispation des premières feuilles, arrêts de croissance, transmission de virus et phytoplasmes.

### **1.6.3.3. Nématodes**

Parmi les espèces de nématodes à galles capables de provoquer des dégâts sur les racines de carottes, on retrouve des espèces du genre *Meloidogyne* (*Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne hapla*). Les dégâts apparaissent en foyers plus ou moins étendus. Ils se traduisent par l'apparition sur les racines de petites galles sphériques et disposées en chapelet. La partie aérienne peut présenter une croissance réduite accompagnée d'un jaunissement des feuilles.

Les nématodes à kystes se rencontrent plus rarement. Les carottes atteintes sont petites et

déformées (racines fourchues). Les radicelles, anormalement développées et nombreuses, donnent au système racinaire un aspect chevelu caractéristique. L'agent responsable, *Heterodera carotae*, est spécifique et ne peut en principe se perpétuer sur d'autres cultures. Ses kystes peuvent survivre jusqu'à huit ans dans le sol.

Les nématodes du genre *Pratylenchus* spp. sont également des ravageurs de la carotte, ce sont des nématodes endoparasites migrateurs des racines dans lesquelles ils provoquent une nécrose qui affaiblit la plante et favorise l'arrivée de parasites secondaires, notamment des champignons.

## **1.7. La carotte, un modèle en culture *in vitro***

### **1.7.1. Bref historique de la culture *in vitro***

Les premières cultures de cellules végétales isolées sur un milieu nutritif artificiel ont été faites par Haberlandt en 1902. Par la suite, des cultures indéfinies de tissus végétaux indifférenciés (cals) ont été réalisées pour la première fois à partir de racines de carotte (Gautheret, 1939). Dans les années 1950, la formation d'embryons somatiques a été mise au point en premier sur des cultures de tissus de carotte (Reinert, 1958 ; Steward *et al.*, 1958).

La carotte a été un modèle dans l'histoire de la culture *in vitro*. Elle est considérée, avec le tabac, comme une espèce modèle pour la culture de tissus, principalement grâce à la facilité avec laquelle il est possible d'obtenir des embryons somatiques à partir de cultures de cellules ou de cals, et à la régénération rapide des plantes (Hardegger et Sturm, 1998). La réponse des tissus de carotte aux différentes inductions en ont fait un modèle pour les études des facteurs favorisant la division cellulaire (George *et al.*, 2008).

La culture *in vitro* de la carotte a offert, depuis plus de 50 ans, plusieurs opportunités de recherches dans les domaines appliqués comme la multiplication conforme d'un grand nombre de plantes à partir d'un génotype unique par embryogenèse somatique (Bajaj, 1995 ; George *et al.*, 2008), ou par culture de protoplastes (Dirks *et al.*, 1996 ; Grzebelus *et al.*, 2012 ; Kameya et Uchimiya, 1972). La culture d'anthères (Adamus et Michalik, 2003 ; Andersen *et al.*, 1990 ; Górecka *et al.*, 2005) puis la régénération d'haploïdes doublés (Górecka *et al.*, 2009 ; Górecka *et al.*, 2010), très utiles dans les programmes de sélection, ont été récemment réalisées chez la carotte. Cet aspect est particulièrement intéressant chez la carotte car, du fait de son allogamie, il est très difficile d'obtenir des lignées homozygotes. De même, la transgénèse est maîtrisée, particulièrement dans le cadre de la validation fonctionnelle de gènes (Baranski *et al.*, 2006 ; Baranski *et al.*, 2008 ; Jayaraj et Punja, 2007 ; Punja, 2005 ; Takaichi et Oeda, 2000 ; Wally et Punja, 2010 ; Wally *et al.*, 2009).

### **1.7.2. Les suspensions cellulaires**

Une variante des cals est la culture de suspensions cellulaires. Ces cultures cellulaires en suspension sont constituées de cellules isolées indifférenciées, en culture dans un milieu nutritif agité afin de faciliter les échanges gazeux et la dispersion des cellules. Les suspensions cellulaires sont généralement initiées par transfert de fragments de cals friables dans un milieu nutritif liquide, mais elles peuvent également être initiées à partir d'explants issus d'organes différenciés, ou de suspensions de protoplastes.

L'utilisation de régulateurs de croissance (balance hormonale auxines/cytokinines) modifie la physiologie des cellules et permet de les conserver dans un état indifférencié.

Le principal intérêt des suspensions cellulaires par rapport aux autres techniques de cultures *in vitro* est que ces suspensions facilitent les expériences sur la physiologie des cellules, de par leur fort taux de croissance et leur homogénéité. De plus, en suspension, la surface de contact des cellules avec le milieu est beaucoup plus importante. Les suspensions cellulaires permettent de nombreuses applications dans des domaines variés comme l'étude de la physiologie cellulaire, la production de métabolites secondaires, l'isolement de protoplastes, l'embryogenèse somatique, l'étude de l'effet de composés exogènes sur l'embryogenèse et la croissance cellulaire (George *et al.*, 2008).

Dans ces cultures cellulaires, le renouvellement régulier du milieu est nécessaire pour maintenir les cellules dans un environnement favorable à la croissance, car la composition du milieu se modifie du fait des échanges entre les cellules et le milieu.

### **1.7.3. L'embryogenèse somatique**

L'embryogenèse somatique est une particularité des végétaux. C'est le processus par lequel des cellules somatiques, *i.e.* non-gamétiques, produisent des embryons normaux du point de vue morphologique et du développement. Dans ce cas, une cellule diploïde se dédifférencie de sorte que, mise dans un milieu adéquat, elle se développe en un embryon qui donne, par la suite, une plante entière (George *et al.*, 2008).

Après avoir été découverts chez la carotte, des embryons somatiques ont été obtenus chez différentes espèces de plantes en utilisant des techniques très variées et à partir de différents types d'explants : microspores, protoplastes, embryons immatures, explants tissulaires et cellules en culture *in vitro* (Hamama, 2002).

Les stades de développement des embryons somatiques sont les mêmes que ceux des embryons zygotiques : ils passent par un stade globule, un stade cordiforme, puis un stade torpille. Au niveau moléculaire, cytologique et morphologique, le développement des deux types d'embryons est très similaire.

Le principe est de permettre à des cellules différenciées d'exprimer leur totipotence en leur faisant subir une dédifférenciation et une multiplication cellulaire par ajout de régulateurs de croissance. En général des auxines sont utilisées, la plus courante étant le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique). Ces auxines sont utilisées seules ou combinées avec des cytokinines

pour induire l'embryogénèse somatique (Mordhorst *et al.*, 1997). Lorsque ces cellules dédifférenciées sont ensuite mises en culture dans un milieu sans auxine, le développement des embryons somatiques a lieu.

Les cellules qui sont en transition de leur état somatique originel vers un état embryogène sont définies comme compétentes. Les cellules qui initient l'embryogénèse après l'élimination du 2,4-D sont définies comme embryogènes (Toonen *et al.*, 1994). L'acquisition d'un état embryogène n'est pas un processus d'une cellule seule, mais requiert une communication entre les cellules (Mordhorst *et al.*, 1997).

Les cellules passent par plusieurs phases de développement. Les cellules compétentes issues de cellules somatiques forment des masses pro-embryogènes (Pro-Embryotic Masses ou PEMs) de 10 à 20 cellules en présence d'auxines. Durant cette étape, les cellules formant la masse acquièrent la capacité de se développer en embryon lorsque l'auxine est retirée du milieu (Guzzo *et al.*, 1994) : après transfert de ces masses pro-embryogènes dans un milieu sans régulateurs de croissance (milieu -RC), on observe une division rapide menant à la formation d'embryons globulaires qui se développent en passant par le stade cordiforme et le stade torpille. Après une phase de conversion, les embryons se transforment en plante entière, avec ses deux pôles, caulinaire et racinaire.

Un grand nombre d'embryons peut être produit dans un petit volume de liquide, et à partir de ceux-ci un grand nombre de plantes peuvent être obtenues. Cette technique est utilisée de manière industrielle pour la multiplication de nombreuses espèces comme le caféier ou le cacaoyer par exemple. Elle est également utilisée par les compagnies semencières pour maintenir et multiplier les lignées parentales élites de leur hybrides commerciaux.

L'embryogénèse somatique porte une attention particulière en biotechnologie car elle fournit un système utile pour produire des plantes. Une des applications les plus importantes de l'embryogénèse somatique est l'étude des processus biochimiques de la cellule (Hamama, 2002).

## 2. L'agent pathogène : *Alternaria dauci*

La carotte peut être confrontée à de nombreuses maladies, dont les brûlures foliaires (cf. § 1.6. de ce chapitre). Les brûlures foliaires sont des maladies dues à différents agents pathogènes, mais aux symptômes similaires (taches nécrotiques coalescentes entourées ou non d'un halo chlorotique). Les symptômes étant très similaires (Blancard et Dubourg, 2001), la distinction sur le terrain n'est pas toujours possible. Cependant, en fonction de l'agent causal, on peut distinguer l'alternariose ('*Alternaria Leaf Blight*' en anglais) provoquée par le champignon *Alternaria dauci*, la cercosporiose (*Cercospora carotae*) et la brûlure bactérienne (*Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* = *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*). Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'alternariose.

### 2.1. Dégâts et importance économique de l'alternariose

L'alternariose a été décrite pour la première fois en 1855 par Kühn en Allemagne, puis en 1890 aux États-Unis (Farrar *et al.*, 2004). Il s'agit aujourd'hui de la maladie la plus destructive sur cette culture, pour la carotte de consommation comme pour la carotte porte-graine (Pryor *et al.*, 2002 ; Farrar *et al.*, 2004). Régulièrement, de nouvelles publications font état de son extension dans une nouvelle zone de production (par exemple, Soyly *et al.*, 2005). On peut donc considérer que *A. dauci* est mondialement présent dans toutes les zones de production de la carotte.

*A. dauci* est capable d'infecter la plante à tous les stades de son développement. Les pertes se manifestent dès le stade plantule où l'on peut observer une diminution de la densité de semis. En culture de carottes de consommation, les attaques peuvent également conduire à une réduction significative des rendements due à la mobilisation des réserves racinaires pour la régénération du feuillage, mais surtout à l'impossibilité de récolter les racines. En effet, les feuilles fragilisées par *A. dauci* se cassent au moment de la récolte (récolte mécanique par préhension des fanes) et la racine reste dans le sol. Le champignon est également responsable

de destruction ou de dépréciation des plantes porte-graine avec pour conséquences des pertes de rendement et la contamination des semences (Gaube *et al.*, 2004). De ce fait, la qualité germinative des semences peut être très fortement affectée. Elles constituent aussi une source d'inoculum et un moyen de propagation du champignon ce qui le classe parmi les agents pathogènes transmissibles par les semences. En conséquence, la contamination par *A. dauci* est une cause de refus de lot de semences par les établissements semenciers.

Il existe peu de données concernant l'impact économique quantitatif d'*A. dauci* car les dégâts qu'il engendre se situent à des moments très différents du cycle de culture et s'additionnent à des attaques provoquées par d'autres agents pathogènes. Cependant, quelques études montrent ponctuellement le fort impact de cette maladie. Ainsi, en 2003, environ 80 % des champs de carotte de la région de Hatay en Turquie étaient infectés par *A. dauci* (Soylu *et al.*, 2005). De même, en Israël, *A. dauci* est responsable de pertes de rendement allant de 40 à 60 % (Ben-Noon *et al.*, 2001). En particulier, ces pertes peuvent être considérables lorsque la récolte est rendue impossible du fait d'une destruction trop importante du feuillage.

## 2.2. Présentation de l'espèce *Alternaria dauci*

### 2.2.1. Le genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* renferme plus de 100 espèces de champignons extrêmement répandues dans l'environnement (Simmons, 1992 ; Guillemette, 2003). La plupart de ces espèces sont saprophytes, mais d'autres sont pathogènes pour l'Homme, pour les insectes ou pour les plantes (Guillemette, 2003 ; Thomma, 2003). La majorité des espèces du genre *Alternaria* est cependant associée aux plantes ; plus d'une soixantaine, saprophytes ou pathogènes, sont régulièrement signalées sur semences (Champion, 1997).

Les *Alternaria* pathogènes sont généralement inféodés à une famille ou à une espèce donnée. La gamme de plantes hôtes concernées par les attaques d'*Alternaria* est très variée, allant des céréales (*A. triticina*) aux cultures maraichères (*A. dauci* et *A. radicina* sur carotte, *A. solani* sur tomate et pomme de terre, *A. porri* sur poireau, *A. brassicae* et *A. brassicicola* sur radis et chou), aux cultures fruitières (*A. mali* sur pommier, *A. citri* sur citron et orange) ou encore le tabac (*A. longipes*), le coton (*A. macrospora*) ou le lin (*A. linicola*) (Rotem, 1994 ; Guillemette, 2003).

Par ailleurs, d'autres espèces d'*Alternaria* sont exploitées dans des programmes de lutte biologique. Elles représentent en effet un potentiel en tant que mycoherbicides, notamment *A. alternata* contre *Amaranthus retroflexus* (Lawrie *et al.*, 2000), *A. eichhorniae* contre la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*) (Shabana *et al.*, 1995) ou encore *A. zinniae* contre différentes espèces de *Xanthium* spp. (Nehl et Brown, 2000).

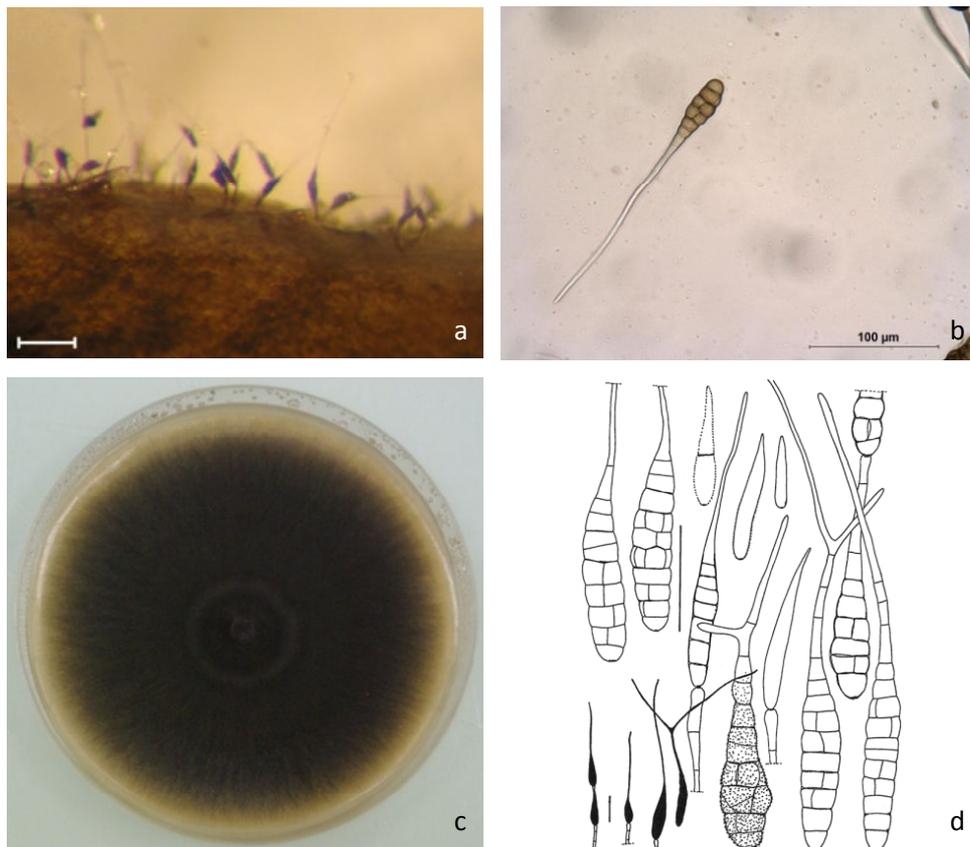
D'un point de vue taxonomique, le genre *Alternaria* est classé dans la division des

*Ascomycota*, l'ordre des *Pléosporales* (champignons ayant des conidiophores peu différenciés, libres, à croissance sympodiale et des conidies qui ne se forment pas dans un réceptacle spécial) et la famille des *Pleosporaceae* (Index Fungorum [Internet]).

Les champignons du genre *Alternaria* ont historiquement été classés parmi les Deutéromycètes (*Deuteromycota*, *Fungi Imperfectii*), un phylum regroupant les champignons à mycélium cloisonné dont on ne connaît pas la forme de reproduction sexuée, s'ils en ont une. Pour certaines espèces d'*Alternaria*, des formes parfaites (sexuées) ont été décrites, et classées dans des genres proches entre eux (*Clathrospora*, *Leptosphaeria*, *Lewia*, *Pleospora*) (Index Fungorum [Internet]).

### 2.2.2. L'espèce *Alternaria dauci*

Des études phylogénétiques ont montré qu'*Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko 1944 appartenait au sous-groupe *porri* du genre *Alternaria*, qui regroupe notamment *A. crassa*, *A. macrospora*, *A. porri*, *A. solani*, *A. tomatophila* et *A. zinniae* (Farrar *et al.*, 2004 ; Andersen *et al.*, 2008). D'autres espèces d'*Alternaria* attaquent la carotte : *Alternaria radicina* (*Alternaria* black rot) et *Alternaria carotiincultae* (Farrar *et al.*, 2004).



**Figure 8 :** Morphologie d'*Alternaria dauci*. (a) conidiophores et conidies sur feuille de carotte, barre = 100 µm (Boedo *et al.*, 2012), (b) conidie observée au microscope (souche FRA017) (cliché personnel), (c) développement in vitro du champignon (souche FRA017) sur milieu V8 (cliché personnel), (d) schéma de conidies, barre = 50 µm (Simmons, 1995).

Chez *A. dauci*, seule une reproduction asexuée sous forme de conidies est connue. Le mycélium, les conidiophores et les conidies d'*A. dauci* sont de couleur foncée, brune ou noire. Les conidiophores mesurent environ 80 µm de long, 7-11 µm d'épaisseur et portent des conidies de 80 à 100 µm de long (corps de la spore) (Fig. 8). Les conidies matures possèdent un long bec terminal (200 à 250 µm). Ce filament qui est souvent simple peut parfois se ramifier en deux ou trois branches (Champion, 1997 ; Farrar *et al.*, 2004). Les conidies sont produites isolément, chaque conidiophore n'émettant qu'une seule spore à son apex. Ces conidies sont pluricellulaires, elles sont cloisonnées transversalement et longitudinalement (Simmons, 1995). Comme toutes les conidies des champignons appartenant au genre *Alternaria*, les conidies d'*A. dauci* sont mélanisées ce qui leur donne leur couleur foncée.

En conditions *in vitro*, la croissance radiale et la sporulation sont favorisées par une alternance de période de lumière et d'obscurité. Le pH n'a pas d'impact sur la sporulation, par contre des valeurs comprises entre 6 et 8 favorisent la croissance mycélienne (Roy, 1969).

Au niveau moléculaire, l'espèce a été relativement peu étudiée. En particulier, le génome d'*A. dauci* n'est pas encore séquencé. En revanche, le génome d'*A. brassicicola* (espèce proche, pathogène nécrotrophe des Brassicacées) est disponible (Joint Genome Institute [Internet] ; The Genome Institute [Internet]). De plus, le transcriptome d'*A. dauci* a récemment été obtenu par l'équipe FungiSem de l'IRHS, en collaboration avec R. Berruyer de l'équipe QuaRVeg.

### 2.3. Symptomatologie de la maladie

Les symptômes provoqués par *Alternaria dauci* correspondent à des brûlures foliaires. Pendant la colonisation, les cellules adjacentes au mycélium perdent leur chlorophylle et deviennent nécrotiques. Ces symptômes apparaissent 8-10 jours après l'infection (Strandberg, 1992). Ce sont de petites lésions brun-verdâtre, qui s'agrandissent et forment des nécroses brun-noir entourées d'un halo chlorotique (Fig. 9a). En conditions favorables pour le développement du champignon, les lésions coalescent et engendrent une sénescence précoce du feuillage et la réduction du nombre de feuilles vivantes par plante (Fig. 9b). Les lésions sont communément observées en bordure des folioles, mais peuvent apparaître sur toutes les parties de la feuille (limbe et pétiole) (Farrar *et al.*, 2004). Des lésions larges et/ou nombreuses sur le pétiole peuvent entraîner la mort de la feuille et les infestations sévères peuvent engendrer une défoliation complète de la plante (Farrar *et al.*, 2004).

On considère généralement qu'*A. dauci* se développe sur les feuilles de carotte les plus âgées, lorsque les plantes ont atteint le stade 7-8 feuilles. Le stade 2-3 feuilles serait également très sensible (Le Clerc, com. pers.). Les tous premiers symptômes se présentent sous forme de très petites taches disséminées et peu visibles. Au cours du temps, ces symptômes se développent et la carotte forme de nouvelles feuilles. En conséquence les 2<sup>e</sup> et

3<sup>e</sup> feuilles, qui ont été attaquées bien plus tôt, montrent les symptômes les plus visibles sur les plantes ayant atteint le stade 7-8 feuilles.



**Figure 9 :** Symptômes d'*A. dauci* sur carotte, (a) symptômes sur feuille (génotype *Presto*) (Boedo et al., 2010), (b) dégâts observés au champ, les feuilles âgées sont entièrement détruites (Farrar et al., 2004).

Des confusions sont possibles en ce qui concerne les symptômes causés par *A. dauci* et *Cercospora carotae*. Cependant *A. dauci* se manifeste tardivement en saison alors que la cercosporiose apparaît plus précocement (Villeneuve et Leteinturier, 1992a ; Pickle, 2009). Bien que les symptômes sur les feuilles soient les plus communs, *A. dauci* peut également infecter les inflorescences, les semences et les plantules.

Sur porte-graine, la brûlure des feuilles apparaît au stade floraison. L'infection des bourgeons floraux et des fleurs peut mener à la contamination des semences en développement. Les fleurs qui sont infectées précocement donnent des semences non viables (Strandberg, 1983).

Au niveau des semences, des contradictions existent en ce qui concerne la localisation d'*A. dauci* dans les tissus. D'après Strandberg (1983), le champignon reste dans le péricarpe et ne pénètre pas dans l'embryon, ni dans l'albumen, mais d'après Champion (1997), la localisation du champignon dans la semence est parfois très profonde et l'albumen ainsi que l'embryon peuvent être envahis. Les semences infectées par *A. dauci* peuvent transmettre l'agent pathogène dans de nouvelles zones de production de la carotte ou disséminer de nouvelles souches dans des aires de production déjà contaminées (Strandberg, 1988a).

Les plantules de carotte peuvent être colonisées par le mycélium du champignon issu d'une semence contaminée ou de l'inoculum du sol. Les attaques précoces peuvent aussi conduire à des fontes de semis. L'infection des plantules apparaît typiquement au niveau du collet. Les tissus infectés de la plantule se nécrosent puis se dessèchent et deviennent brun-noir. En conditions favorables, le champignon présent sur les plantules infectées peut produire des conidies en abondance, qui serviront alors de source d'inoculum secondaire (Farrar et al., 2004).

## 2.4. Épidémiologie et cycle parasitaire

### 2.4.1. Infection primaire

Des conditions humides dues aux précipitations, à la rosée, ou à l'irrigation sont des facteurs clés pour l'initiation de l'épidémie (Farrar *et al.*, 2004 ; Strandberg, 1977). La maladie se manifeste essentiellement en fin d'été mais on peut observer des dégâts d'*A. dauci* dès le mois de mai et jusqu'à octobre si les conditions climatiques sont favorables (Langenberg *et al.*, 1977 ; Vintal *et al.*, 1999). À l'automne, après récolte, *A. dauci* se développe en saprophyte sur les résidus de culture, à partir desquels il reformera un inoculum primaire (Agrios, 2005).

Le cycle d'*A. dauci* est similaire à ceux des autres espèces d'*Alternaria* (Fig. 10) responsables de maladies foliaires (Farrar *et al.*, 2004 ; Agrios, 2005).

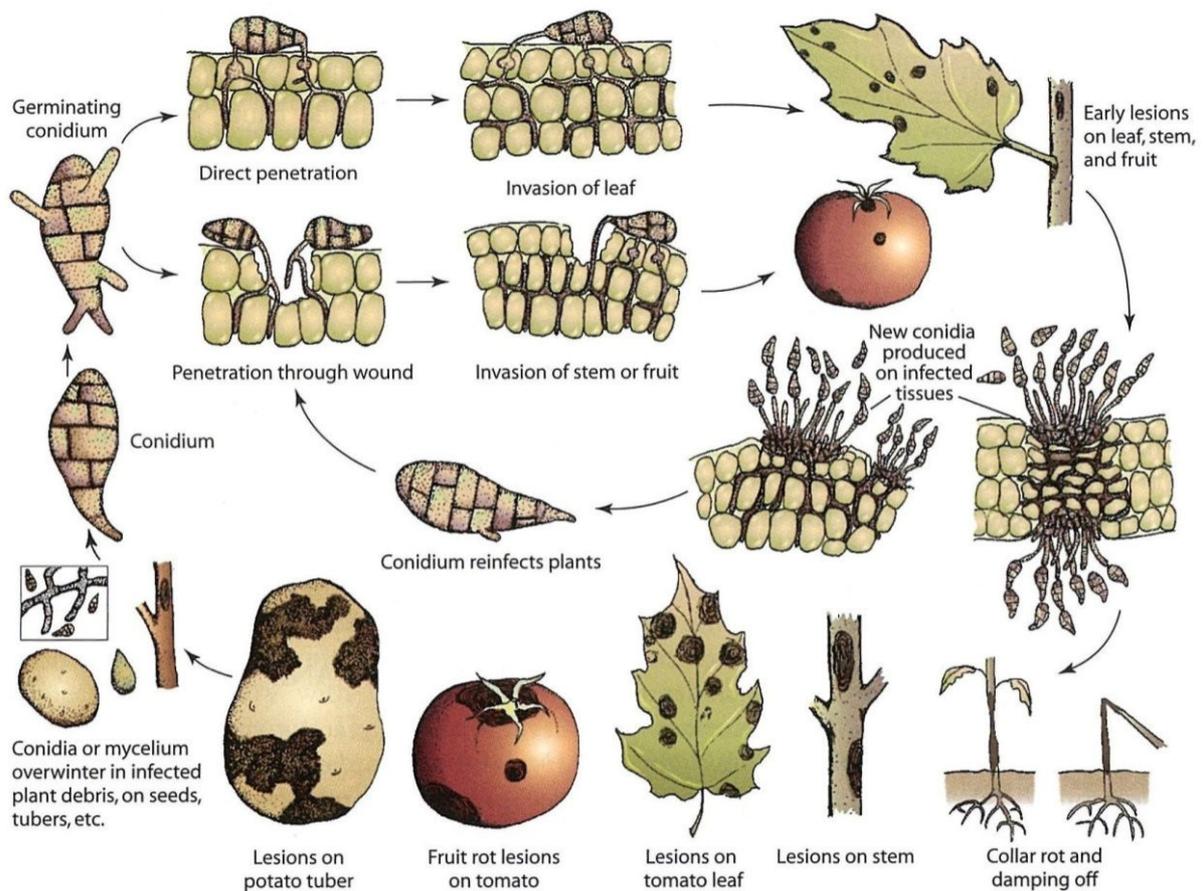


Figure 10 : Développement et symptômes de maladies causées par *Alternaria* spp. (Agrios, 2005).

Les sources d'inoculum primaire regroupent le mycélium contenu dans les résidus de culture de carotte, les carottes sauvages malades, et les semences infectées. Les débris de culture en sont la principale source. *A. dauci* peut survivre dans les débris de carotte pendant

près d'un an (Farrar *et al.*, 2004).

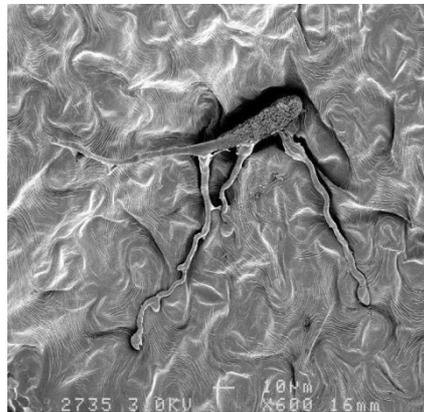
Les conidiophores et les conidies sont produits dans une gamme de température allant de 8 à 28 °C, si l'humidité relative est supérieure à 96 % ou en présence d'eau sur la surface des plantes (Rotem, 1994). Une fois les conidies libérées, elles sont dispersées par le vent et l'eau (pluie et irrigation) (Roy, 1969), cette dispersion augmente lorsque l'humidité relative diminue (Strandberg, 1977).

Les conidies se déposent ensuite sur la surface des feuilles où elles germent et infectent les tissus. À 24 °C, les dégâts sont plus sévères si la feuille reste humide pendant une période prolongée (Roy, 1969). Inversement, le taux d'infection est fortement réduit par des températures nocturnes inférieures à 12°C (Strandberg, 1988b).

La période infectieuse est définie par le nombre de jours durant lesquels les conidies sont produites. La période infectieuse des *Alternaria* spp. est longue car elle commence sur feuilles vivantes et se poursuit après la mort des tissus infectés (Rotem, 1994).

#### 2.4.2. Développement du champignon sur la plante hôte

La première étape du cycle infectieux est l'adhésion de l'agent pathogène à la surface de la plante hôte. Ensuite, les conidies d'*A. dauci* germent rapidement, en moins de cinq heures après l'inoculation. Les conidies sont composées de plusieurs cellules, chacune pouvant donner naissance à un tube germinatif (Fig. 11).



**Figure 11** : Conidie d'*A. dauci* en germination à la surface d'une feuille de carotte (Boedo, 2009).

Les tubes germinatifs adhèrent fortement à la cuticule en sécrétant un abondant mucilage constitué de polysaccharides ou de glycoprotéines (Boedo, 2009 ; Hatzipapas *et al.*, 2002). Suite à l'adhésion et à la germination, une étape importante du cycle infectieux est la pénétration du champignon dans les tissus de la plante hôte. Les champignons phytopathogènes possèdent deux stratégies non exclusives de pénétration dans les tissus végétaux : mécanique et enzymatique. La pénétration mécanique nécessite la différenciation de structures infectieuses spécialisées appelées appressoria. Chez les *Alternaria* spp., la

preuve de la formation d'appressoria vrais n'est pas évidente, et certains auteurs décrivent plutôt une structure de type « appressorium-like » (Boedo *et al.*, 2008 ; McRoberts et Lennard, 1996 ; Prasad *et al.*, 1990). En revanche, les *Alternaria* spp. synthétisent des enzymes hydrolytiques (Rotem, 1994). De façon générale, la dégradation de la cuticule et de la paroi végétale nécessite des cutinases, des lipases, des galacturonidases, des pectine-lyases et des pectine-méthylestérases (Thomma, 2003).

*A. dauci* pénètre au travers des jonctions inter-cellulaires, il réalise sa pénétration en formant des appressorium-like et vraisemblablement en sécrétant des enzymes hydrolytiques (Boedo, 2009). La pénétration via les stomates ou les blessures a été observée, mais de façon plus marginale (Boedo, 2009).

L'intense colonisation des tissus végétaux se traduit ensuite par la présence d'un réseau dense d'hyphes sous-cuticulaires. Boedo (2009) a montré, via différentes techniques de microscopie, que le champignon est présent de manière extra et intra-cellulaire.

La présence des hyphes provoque la rupture de la paroi cellulaire végétale et la perte de l'organisation cytoplasmique (Dugdale *et al.*, 2000 ; Boedo, 2009). De telles modifications physiques chez la plante hôte suggèrent l'implication de phytotoxines dans les mécanismes d'action d'*A. dauci* (Dugdale *et al.*, 2000). L'infection conduit à la formation de lésions nécrotiques, le champignon se situe au centre de la lésion qui est entourée d'un halo chlorotique. Cette zone est créée par la diffusion de métabolites fongiques telles que les toxines (Thomma, 2003).

Le cycle infectieux des champignons phytopathogènes se termine généralement par l'étape de sporulation qui assure la survie et la dissémination du pathogène. Dans le cas du pathosystème *A. dauci*-carotte, l'émergence des conidiophores s'amorce à partir des hyphes sous-cuticulaires (Boedo, 2009). Les conditions favorables à la formation des conidies elles-mêmes sont les mêmes que pour l'inoculum primaire : 8 à 28° C, 96-100% HR.

## 2.5. Déterminisme du pouvoir pathogène

On peut distinguer trois catégories de champignons phytopathogènes en fonction de leur mode de nutrition, qui peut être biotrophe, hémibiotrophe ou nécrotrophe.

Les champignons biotrophes établissent une relation trophique avec les cellules végétales vivantes. Ils différencient des structures d'absorption intra-cellulaires particulières appelées haustoria, leur permettant de prélever des nutriments directement dans les cellules végétales sans provoquer leur mort. Souvent, leur culture sur milieu artificiel est difficile, voire impossible. On compte parmi eux les champignons responsables des rouilles et des oïdiums.

Les champignons nécrotrophes quant à eux, tuent les cellules végétales (notamment par l'action de toxines) en avant du front de développement de la lésion qu'ils provoquent et colonisent les tissus végétaux morts en quasi-saprophytes. Les *Alternaria* phytopathogènes,

dont *A. dauci*, sont des champignons nécrotrophes (Agrios, 2005). On peut aussi citer dans cet ensemble les genres *Cochliobolus* ou *Botrytis*.

Les agents hémibiotrophes constituent une classe intermédiaire d'agents pathogènes capables d'engager une relation biotrophe avec leur hôte, puis de passer ensuite à un comportement nécrotrophe. On retrouve dans cet ensemble le champignon pathogène *Magnaporthe oryzae* ou encore les *Colletotrichum* spp. responsables des anthracoses.

### 2.5.1. Les toxines fongiques

La stratégie de colonisation des champignons nécrotrophes consiste à tuer les cellules végétales et à dégrader leurs structures avant de s'en nourrir. La mort des cellules hôtes est provoquée par des toxines qui affectent généralement la perméabilité des membranes ou le fonctionnement de certaines enzymes (Guillemette, 2003). Ces toxines sont dans la majorité des cas des métabolites secondaires de faible poids moléculaire efficaces à de très faibles concentrations (Walton, 1996 ; Thomma, 2003 ; Berestetskiy, 2008).

Les phytotoxines peuvent être divisées en deux catégories. Une première catégorie regroupe les toxines spécifiques de l'hôte (Host-Specific Toxins ou HSTs). Ces composés sont toxiques, aux concentrations physiologiques, pour certaines plantes mais n'exercent aucun effet sur d'autres, et sont ainsi directement à l'origine du spectre d'hôte des champignons qui les produisent (Walton, 1996). La plupart des HSTs sont des métabolites secondaires (terpénoïdes, oligosaccharides, peptides) possédant une grande diversité au niveau de leur structure chimique et de leurs effets biologiques. Ces métabolites sont généralement présents sous forme de petites molécules diffusibles dans les tissus de la plante. Les HSTs sont les déterminants primaires du pouvoir pathogène. Elles représentent une composante qualitative du pouvoir pathogène (virulence) (Walton, 1996). La sensibilité des plantes aux HSTs est souvent soumise à un contrôle monogénique. Il a été émis l'hypothèse que la présence de récepteurs appropriés est nécessaire pour que la toxine puisse agir. En outre, comme les HSTs sont des agents de compatibilité, en cas d'absence de ces récepteurs, la plante est alors résistante à l'agent pathogène producteur de la toxine (Walton et Panaccione, 1993).

Une deuxième catégorie de toxines renferme les toxines non spécifiques de l'hôte (Non-Host-Specific Toxins ou NHSTs) considérées comme des déterminants secondaires du pouvoir pathogène et intervenant dans sa composante quantitative (agressivité). Elles ne sont pas nécessaires à l'initiation du processus infectieux, mais contribuent à augmenter l'intensité des symptômes de la maladie (Thomma, 2003). Contrairement aux HSTs, ces composés exercent leur toxicité sur une grande variété d'espèces (Guillemette, 2003).

De nombreuses NHSTs ont été isolées à partir de cultures de champignons et de bactéries. Parmi les toxines produites par des champignons, citons l'acide fumarique produit par *Rhizopus* spp., l'acide oxalique produit par des espèces des genres *Sclerotium* et *Sclerotinia*, les ophiobolines produites par plusieurs espèces de *Cochliobolus*, l'acide fusarique et la lycomarasmine produits par *Fusarium oxysporum* (Agrios, 2005).

### 2.5.2. Les toxines d'*Alternaria* spp.

Les HSTs connues sont essentiellement produites par les champignons appartenant aux genres *Alternaria* et *Cochliobolus* (syn. *Helminthosporium*). Le genre *Alternaria* renferme une dizaine d'espèces pathogènes productrices de HSTs, ce qui leur confère un spectre d'hôte distinct et restreint (Otani *et al.*, 1995). Chaque espèce, parfois même chaque pathotype au sein d'une espèce, produit un spectre de toxines qui lui est propre (Thomma, 2003). C'est notamment le cas des pathotypes appartenant à l'espèce *Alternaria alternata* (Kusaba et Tsuge, 1995).

Parmi ces toxines, citons par exemple la toxine AAL (sur tomate), la toxine ACT (sur mandarinier), la toxine AF (sur fraisier), la toxine AK (sur poirier japonais), la toxine AM (sur pommier), la toxine AS (sur tournesol), produites par *A. alternata*, ou encore la toxine AB et la destruxine B produites par *A. brassicicola* (Thomma, 2003).

Ces HSTs agissent à plusieurs niveaux : elles provoquent la perte d'électrolytes des tissus végétaux et l'altération des membranes, elles affectent les chloroplastes et/ou les mitochondries. Dans certains cas, la réponse de l'hôte à ces toxines peut être quantifiée par le dosage des pigments chlorophylliens (Dugdale *et al.*, 2000)

Chez *Alternaria* spp., de nombreuses toxines non hôte spécifiques (NHST) ont également été identifiées, mais leur action précise n'a été étudiée en détail que pour quelques unes d'entre elles (Thomma, 2003 ; Andersen *et al.*, 2008). Plus de 30 composés potentiellement toxiques ont été isolés à partir d'espèces du genre *Alternaria* (Ostry, 2008). Les toxines les plus importantes se répartissent dans les quatre groupes suivants (Andersen *et al.*, 2008 ; Barkai-Golan et Paster, 2008 ; Gamboa-Angulo *et al.*, 2000 ; Gamboa-Angulo *et al.*, 2002 ; Thomma, 2003) :

- dérivés de dibenzopyrone (alternariol, éther monométhyle d'alternariol, altenuène)
- dérivés du pérylène (altertoxine I, II, III)
- dérivés de l'acide tétramique (acide tenuazonique)
- polykétides (zinniol)

Plusieurs espèces d'*Alternaria* détériorent les aliments en produisant des mycotoxines. Parmi ces composés, plusieurs (notamment l'alternariol, l'éther monométhyle d'alternariol, les altertoxines et l'acide tenuazonique) sont particulièrement toxiques pour les mammifères (Guillemette, 2003 ; Ostry, 2008).

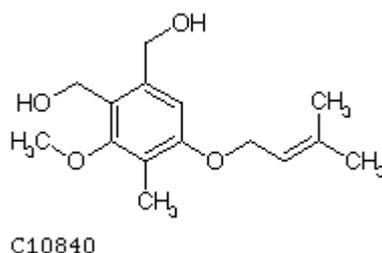


Figure 12 : Molécule de zinniol (KEGG [Internet]).

Parmi les NHSTs, on distingue le zinniol (Fig. 12). C'est un composé phytotoxique purifié la première fois par White et Starratt (1967) à partir de cultures d'*A. zinniae* (pathogène du zinnia et du tournesol). L'application d'une solution de zinniol à 50 µg/mL au niveau de blessures de feuilles appartenant à plusieurs espèces botaniques (brocoli, carthame, chou, coton, haricot, navet, oignon) induit des réactions toxiques ce qui montre le caractère non spécifique de cette toxine (Cotty et Misaghi, 1984).

La production de zinniol a été mise en évidence chez *A. dauci* (Barash *et al.*, 1981), *A. porri* (Yu *et al.*, 1983), *A. carthami*, *A. macrospora*, *A. solani* et *A. tagetica* (Cotty et Misaghi, 1984). Le zinniol a également été mis en évidence chez un champignon n'appartenant pas au genre *Alternaria*, *Phoma macdonaldii* (Sugawara et Strobel, 1986), pathogène du tournesol.

Le zinniol a été mis en évidence chez *A. dauci* à partir de mycélium et de filtrat issu des fluides de germination de conidies (Barash *et al.*, 1981). Les auteurs ont supposé que le zinniol était synthétisé par les conidies germantes avant la pénétration et qu'il serait donc susceptible de faciliter la pénétration dans les tissus hôtes. Le zinniol est produit dans les tubes germinatifs et dans les jeunes hyphes et interviendrait dans les mécanismes du pouvoir pathogène du champignon (Thuleau *et al.*, 1988).

Cette toxine altère la perméabilité des membranes plasmiques et des membranes des chloroplastes. L'application de zinniol purifié sur des feuilles de carotte conduit à des symptômes similaires à ceux observés après l'inoculation d'*A. dauci* (Barash *et al.*, 1981). Cependant, la concentration de zinniol nécessaire à l'apparition de symptômes sur feuilles détachées étant élevée (1 mM (Barash *et al.*, 1981) ; 1,8 mM (Montillet, 1986)), le rôle primaire de cette molécule dans le développement de la maladie est remis en cause. Notamment récemment, où certains auteurs émettent un doute sur le rôle réel du zinniol en tant que phytotoxine, à partir d'études basées sur l'application de zinniol sur des cultures cellulaires (Qui *et al.*, 2010).

Le zinniol a été dosé par une méthode radio-immunologique dans des feuilles de carotte infectées artificiellement (Montillet, 1986). Ce travail a permis de montrer que la répartition de la toxine n'était pas homogène dans les tissus de la plante.

En plus du zinniol, *A. dauci* produit également de l'alternariol et de l'éther monométhyle d'alternariol ainsi que d'autres métabolites encore non identifiés à ce jour (Andersen *et al.*, 2008 ; Ostry, 2008).

## 2.6. Gamme d'hôtes et agressivité chez l'espèce *A. dauci*

*A. dauci* attaque principalement la carotte. Il a été également signalé chez d'autres espèces cultivées (céleri, cerfeuil commun, coriandre, aneth, fenouil, persil, mâche, cresson, radis et tomate) (Felix et Orioux, 1963 in Boedo *et al.*, 2012 ; Joly, 1964 in Boedo *et al.*,

2012 ; Boedo *et al.*, 2012), mais la présence d'infection sur d'autres plantes hôtes que la carotte est rarement rapportée autrement que dans des conditions artificielles. La gamme d'hôte reste donc à étudier en conditions d'infestation naturelle.

*A. dauci* a également été isolé à partir de symptômes observés sur plusieurs espèces sauvages appartenant à la famille des *Apiaceae*. Le champignon a notamment été isolé à partir de panais sauvage (*Pastinaca sativa*) et différentes espèces de carottes sauvages appartenant au genre *Daucus*, se trouvant à proximité de carottes cultivées (Soteros, 1979). En conditions artificielles, une forte intensité de maladie due à *A. dauci* a été observée après inoculation de différents génotypes de *Daucus* sauvages (Boedo *et al.*, 2012).

Des travaux menés par Benichou *et al.* (2009), ont démontré qu'il existe une forte variabilité génétique au sein de l'espèce *A. dauci*. En particulier cette diversité génétique est supérieure à celle observée chez *A. brassicicola*.

Cette diversité est également visible du point de vue des niveaux d'agressivité du champignon (Boedo *et al.*, 2012). À partir de onze isolats sélectionnés d'après leur diversité selon l'origine géographique, la plante hôte et le polymorphisme des régions IGS (Intergenic Spacer), ces auteurs ont montré une variation continue dans l'agressivité de ces isolats. Cependant, certains isolats sont significativement différents des autres du point de vue de leur agressivité mettant en évidence quatre niveaux d'agressivité.

## 2.7. Méthodes de lutte

Le contrôle d'*A. dauci* est nécessaire si l'on veut réduire les dégâts occasionnés par la maladie. La première manière de combattre la maladie consiste à prévenir les attaques. Les principales méthodes de lutte sont l'utilisation de semences saines, l'application de fongicides, les pratiques culturales et la sélection de variétés résistantes. Lorsque la pression de la maladie est forte, aucune de ces méthodes n'est suffisante si elle est utilisée seule.

### 2.7.1. Semences saines

À l'installation de la culture, une contamination faible, voire absente est une première étape dans le contrôle de la maladie. L'utilisation de semences saines permet de ne pas importer un inoculum primaire lors de la mise en place de la culture. L'analyse de la qualité sanitaire des semences, permet de définir le niveau de contamination des lots de semences.

Les semences peuvent être traitées à l'eau chaude ou avec des fongicides, ce qui diminue les risques de transmission de la maladie par les semences, limitant ainsi les infections précoces dans les cultures (Strandberg, 1984 ; Strandberg et White, 1989 ; Koch *et al.*, 2010). Le pelliculage avec le thirame ou l'iprodione réduit significativement la contamination

(Strandberg, 1984 ; Farrar *et al.*, 2004). Un fongicide peut être associé à la solution de « priming » des semences. Cette technique du « priming » permet d’amorcer la germination et de l’arrêter avant la percée de la radicule, afin d’obtenir une levée homogène au champ et limiter les fontes de semis dues à *A. dauci* (Maude *et al.*, 1992).

### **2.7.2. Méthodes culturales**

Les pratiques culturales doivent permettre de réduire la pression de la maladie et les risques de propagation, il conviendra ainsi d’éliminer les débris cultureux, les adventices et de pratiquer des rotations afin de limiter les sources d’inoculum primaire. Les rotations permettent de diminuer la quantité d’inoculum en permettant la décomposition des débris de culture, support du champignon durant l’interculture. La rotation doit être suffisamment longue pour permettre la décomposition complète des débris de culture et de ce fait éliminer le champignon.

La résistance de l’hôte est aussi influencée par les pratiques culturales, en particulier la fertilisation. Une fertilisation une fois et demi supérieure au niveau recommandé, provoque une augmentation de la maladie de l’ordre de 23 à 30 % (Vintal *et al.*, 1999). De même, une irrigation excessive, maintenant une forte humidité au niveau du feuillage, est un facteur influençant grandement le développement de la maladie (Rotem, 1994).

Des études sur l’impact de la taille (« trimming ») du feuillage ont été menées au Canada (McIsaac *et al.*, 2009 ; Pickle, 2009). Il s’agit d’éliminer une partie du feuillage des carottes, à l’aide d’un engin équipé de disques coupant les feuilles entre les rangs, afin de permettre une meilleure aération des plantes et ainsi diminuer l’humidité relative dans l’environnement des plantes. Ces auteurs observent alors une diminution de plusieurs maladies dont l’alternariose.

Il est également conseillé d’inspecter régulièrement les cultures pour dépister à temps les zones d’infection. Le semis de deux rangs d’une variété sensible à la brûlure foliaire à proximité de la parcelle cultivée en carottes, constitue un indicateur pour le déclenchement des traitements chimiques préventifs (Poissonnier *et al.*, 1995).

### **2.7.3. Lutte chimique durant la culture**

Dans la plupart des régions de production, l’application de fongicide en routine est nécessaire pour contrôler de façon adéquate l’alternariose. Par exemple, l’iprodione est appliqué tous les 14 jours (Poissonnier *et al.*, 1995) et, d’après le CTIFL, il est important d’appliquer de façon préventive les produits dans de bonnes conditions d’efficacité et de tenue (mouillant), avec un renouvellement en cas de lessivage (Poissonnier *et al.*, 1995). Pour que le traitement soit efficace, plusieurs paramètres de la culture sont à prendre en compte notamment, le choix des matières actives, le seuil de dégâts économiques de la maladie, la période d’application en fonction du calendrier des travaux cultureux, le délai avant récolte (Farrar *et al.*, 2004).

Le chlorothalonil et le difénoconazole semblent être les substances les plus efficaces (Ben-Noon *et al.*, 2001). D'autres produits, comme par exemple, le mancozèbe et l'iprodione, semblent moins efficaces, mais ils sont utilisés pour permettre l'alternance destinée à prévenir l'apparition de résistances.

Un certain nombre de molécules sont autorisées par le Ministère français de l'agriculture et de l'agroalimentaire, dans la lutte contre l'alternariose de la carotte, à savoir (Couteux et Lejeune, 2011 ; e-PHY - Ministère de l'agriculture, de l'agro-alimentaire et de la forêt [Internet]) :

- pour le traitement des semences : l'iprodione (le thirame n'est plus autorisé)
- pour le traitement des parties aériennes : le mancozèbe, le cyprodinil, le fludioxonil, le difénoconazole, l'azoxystrobine, le myclobutanil, la pyraclostrobine, le chlorothalonil, le pyriméthanol, et l'iprodione

La protection offerte par ces fongicides s'étend également à d'autres agents pathogènes. Mais dans le cadre du plan Ecophyto 2018, qui vise à réduire et sécuriser l'utilisation des produits phytosanitaires (y compris pour des usages non-agricoles), l'un des objectifs est de diviser par deux l'usage de pesticides avant 2018 (Ministère de l'agriculture, de l'agro-alimentaire et de la forêt [Internet]). Ceci implique qu'un certain nombre de molécules utilisées contre *A. dauci* ne seront peut être plus autorisées dans un délai relativement court, privant ainsi les producteurs d'un moyen de lutte très largement utilisé aujourd'hui.

Par ailleurs, il est aussi possible d'appliquer des traitements non fongicides tel que des stimulateurs de défense naturelle (SDN), ou encore des gibbérellines (phytohormones) pour diminuer la sévérité de la maladie (Santos *et al.*, 2000). L'application d'acide gibbérellique (GA) sur le feuillage réduit le pourcentage de surface de feuilles affectées par *A. dauci*. Le degré de réduction de la maladie avec deux applications de GA est similaire à ce qui a été obtenu avec quatre applications du fongicide iprodione (Santos *et al.*, 2000).

#### **2.7.4. Lutte génétique**

Dans l'état actuel, la protection chimique durant la culture reste la méthode la plus simple et la plus sûre dans le contrôle de l'alternariose, mais elle n'est pas sans conséquence au niveau de l'environnement (apparition de souches pathogènes résistantes aux pesticides, modification de la faune et de la flore du sol, pollution des eaux) et de la santé humaine (contamination des applicateurs, résidus dans les racines consommées). Le développement de résistances aux fongicides a déjà été rapporté dans différents pathosystèmes, et des cas de résistance à l'iprodione ont notamment été documentés chez *Alternaria* spp., dont *A. dauci* (Fancelli et Kimati, 1991 ; Solel, 1996).

Les acteurs de la filière cherchent donc à développer des stratégies alternatives, en particulier en associant différentes approches, dont la lutte génétique (Ben-Noon *et al.*, 2003). Il est montré par exemple que, lors d'attaques importantes, avec une démarche de lutte chimique seule, une efficacité de 58 % pouvait être atteinte ; par contre en l'associant à une

démarche de lutte génétique, l'efficacité s'est avérée atteindre 91 % (Ben-Noon *et al.*, 2003).

Aujourd'hui, bien que certains cultivars de carotte soient moins sensibles que d'autres à la maladie, aucune résistance complète n'a été trouvée (Simon et Strandberg, 1998 ; Pawelec, 2005). Le niveau de tolérance des variétés actuellement disponibles est insuffisant et ne permet donc pas de s'affranchir de la lutte chimique. Toutefois la sélection de variétés a donné naissance à des variétés de carotte possédant un niveau de résistance partielle intéressant, par exemple la variété Boléro qui est devenue une référence du point de vue de la résistance à *A. dauci*. Développer des variétés présentant un niveau de résistance fort et durable est l'un des objectifs principaux des sélectionneurs de l'espèce. Néanmoins de telles variétés, qui doivent combiner résistance aux agents pathogènes et avantages culturels, ne sont pas toujours faciles à obtenir. L'amélioration génétique de la plante par l'introduction de gènes (par sélection classique ou transgénèse) conférant une résistance à des agents pathogènes constitue une alternative potentielle à l'usage de pesticides en grand nombre, mais pour cela il est nécessaire de comprendre comment la carotte peut résister à *A. dauci*.

La transgénèse a été réalisée pour la première fois chez la carotte au début des années 1990 (Doré et Varoquaux, 2006). Des carottes transgéniques résistantes à *A. dauci* ont été créées en utilisant différents gènes de résistance. Takaichi et Oeda (2000) ont mis au point une lignée transformée avec un gène de lysozyme humain. Cette protéine a la capacité de cliver les liaisons  $\beta$ -glycosidiques de la chitine de la paroi fongique. Cette lignée de carotte transgénique produit abondamment le lysoszyme (0,5% des protéines solubles totales) et possède un haut niveau de résistance à *A. dauci*.

Par ailleurs, des carottes transgéniques résistantes à *A. dauci* ont été obtenues par agrotransformation en utilisant une PR protéine de type « thaumatin-like » identifiée chez le riz (classe PR-5). Deux lignées ont été obtenues avec cette méthode, et leur niveau de résistance est bien corrélée au niveau d'expression de la protéine « thaumatin-like » (Punja, 2005). Il a été montré que cette protéine a une localisation extra-cellulaire qui lui confère un rôle dans les réactions précoces de la résistance vis-à-vis d'*A. dauci*.

Plus récemment, des plantes transgéniques de carotte exprimant l'endochitinase CHIT36 ont été utilisés dans des tests de résistance afin d'évaluer leur sensibilité à différents champignons phytopathogènes. Le niveau de résistance exprimé dépend du clone testé, cependant tous présentent un niveau de résistance significativement plus élevé envers *Alternaria radicina* et *Botrytis cinerea*, d'environ 50 % par rapport au témoin non transformé. Une progression plus lente de la maladie causée par *A. dauci* a été observée chez deux plantes transgéniques comparativement à tous les autres transformants. Les résultats de ces travaux montrent donc que l'expression de CHIT36 *in planta* a le potentiel de réduire le développement de maladies fongiques (Baranski *et al.*, 2008).

À notre connaissance, aucune des variétés de carotte transgénique mises au point n'est actuellement commercialisée. Leur utilisation se limite à des besoins expérimentaux. Dans le contexte actuel, l'utilisation de variétés transgéniques pour la consommation humaine est

difficilement envisageable.

## **3. L'interaction plante hôte/agents pathogènes**

### **3.1. Généralités et définitions**

Au cours de leur vie, les plantes sont continuellement confrontées à un grand nombre de microorganismes potentiellement pathogènes mais qui, le plus souvent, n'ont pas d'effet visible. Bien que certains organismes soient capables de parasiter une espèce végétale donnée, dans la plupart des cas, un microorganisme entrant en contact avec une plante ne se développe pas, et aucune maladie n'est observée. La maladie reste un cas particulier de l'interaction.

#### ***3.1.1. Les différents types de résistance***

Deux situations différentes sont donc à considérer : la relation hôte où un parasite peut contaminer un hôte et s'y développer, et la relation non-hôte. La relation non-hôte caractérise l'incompatibilité entre tous les génotypes d'une espèce végétale donnée et tous les biotypes ou isolats d'un agent pathogène déterminé. La relation hôte est quant à elle une relation où, pour une espèce végétale particulière, l'interaction avec un parasite déterminé aboutit parfois à une incompatibilité (plante résistante), et parfois à une compatibilité plus ou moins marquée selon les génotypes (plante sensible ou tolérante) (Agrios, 2005 ; Lepoivre, 2003).

Dans le cas de la relation hôte, certains génotypes végétaux sont donc résistants à une souche d'un agent pathogène, alors que d'autres y sont sensibles. La relation hôte décrit alors les interactions différentes existant entre les différents cultivars d'une espèce végétale donnée et les différents biotypes d'un agent pathogène. Deux types de résistances hôte sont classiquement distingués : la résistance verticale et la résistance horizontale.

La résistance verticale peut être définie par ses trois caractères principaux : totale, différentielle et monogénique. Dans la plupart des cas, le déterminisme de la résistance verticale s'explique par la théorie gène-pour-gène énoncée par Flor en 1942 et selon laquelle l'interaction est incompatible si et seulement si, le produit du gène (souvent dit « majeur ») de

résistance de la plante reconnaît le produit du gène d'avirulence de l'agent pathogène. Lors de réactions incompatibles, on observe fréquemment deux phénomènes que l'on considère comme typiques : La réaction hypersensible (Hypersensitive reaction, ou HR), caractérisée à l'échelle macroscopique par l'apparition rapide d'une petite nécrose non évolutive située sur le lieu de l'inoculation, et la résistance systémique acquise (Systemic Acquired Resistance, ou SAR), correspondant à une élévation du niveau de résistance général de la plante à tous les agents pathogènes suite à cette réaction incompatible.

La résistance horizontale est caractérisée par trois caractéristiques opposées à celles de la résistance verticale : partielle, non différentielle et polygénique. Le niveau observé de la maladie peut varier en fonction du niveau de résistance des cultivars et du niveau d'agressivité des souches du parasite (Agrios, 2005 ; Lepoivre, 2003). Souvent, la résistance horizontale induit, chez l'agent pathogène, une perte de performance sur une ou plusieurs composantes de son cycle de développement. On peut citer par exemple une baisse de l'efficacité d'infection, une augmentation de la période de latence (c'est à dire la période entre l'infection et l'émission de nouvelles spores par l'agent pathogène), ou une baisse de sa capacité à sporuler (Hossard *et al.*, 2010). Les mécanismes de cette résistance sont mal connus mais son induction nécessiterait l'expression de plusieurs gènes, dits mineurs par opposition à la résistance verticale. En conséquence, ce type de résistance est souvent un caractère quantitatif, sous contrôle polygénique impliquant des QTLs (Quantitative Trait Loci).

### ***3.1.2. Le point de vue de l'améliorateur***

Parallèlement à la notion de résistance horizontale, le terme de « tolérance » est aussi employé, en particulier en amélioration des plantes. Un génotype est dit « tolérant » s'il est capable de se développer et d'avoir une production adéquate ou du moins acceptable, alors qu'il est infecté ou malade (Lepoivre, 2003 ; Rappilly, 1991). Le concept de tolérance s'applique également aux causes non parasitaires (Lepoivre, 2003). En d'autres termes, la tolérance correspond à la capacité d'une plante à supporter une agression physique, chimique ou biologique sans trop en souffrir, alors que la résistance est la capacité d'une plante à faire face à l'agression d'organismes pathogènes, et d'en annuler les effets. La notion de résistance partielle recouvre celle de tolérance à une agression d'origine biologique. Elle sera, dans la suite de ce document, employée dans ce sens.

La résistance verticale est une résistance monogénique suivant un déterminisme mendélien, elle a donc une certaine facilité d'utilisation en amélioration. Cette résistance totale permet une observation aisée, ce qui contribue à cette facilité. En conséquence, l'introgression de gènes de résistance dans des génotypes cultivés a largement contribué au développement de variétés résistantes depuis plusieurs décennies. Mais cette résistance verticale, basée sur la reconnaissance spécifique de produits de gènes d'avirulence, risque à tout moment d'être contournée par des souches portant une version mutée de ce gène.

Le contournement des gènes de résistance verticale a amené l'idée qu'il serait nécessaire

de mettre en place une résistance durable des plantes aux maladies (Johnson, 1981). Par « durable », on entend une résistance efficace pendant une longue durée, à large échelle et dans des conditions favorables au développement de la maladie.

De nombreux moyens d'augmenter la durabilité des résistances ont été proposés (pour revue : Wagner, 2012). Une des idées de base est que, plus le nombre de facteurs de résistance à contourner est grand, et plus il sera nécessaire d'accumuler des mutations pour devenir virulent, et plus faible sera la probabilité d'occurrence du contournement par les populations pathogènes (Paloix *et al.*, 2009). Cette stratégie est possible avec des gènes de résistance verticale, on parle alors de pyramidage de gènes (Nelson, 1978 *in* Pedersen et Leath, 1988).

La question de la durabilité a aussi remis au goût du jour l'utilisation de la résistance horizontale en amélioration. En effet, l'effet généralement additif des gènes fait que leur accumulation permettrait d'obtenir un niveau de résistance élevé, et du fait de leurs effets individuels relativement faibles, la pression de sélection exercée par chaque QTL sur la population de l'agent pathogène est moins forte, limitant ainsi le risque de contournement (Paloix *et al.*, 2009). Le recul sur des travaux de sélection anciens permet d'ailleurs de voir cette durabilité. Par exemple, la résistance partielle au mildiou de la variété de pomme de terre 'Kaptah Vandel', obtenue en 1965, est toujours visible aujourd'hui (European Cultivated Potato Database [Internet]). On observe des résultats similaires pour la variété de riz 'Nipponbare', partiellement résistante à la Pyriculariose du riz, et obtenue au Japon dans les années 1920.

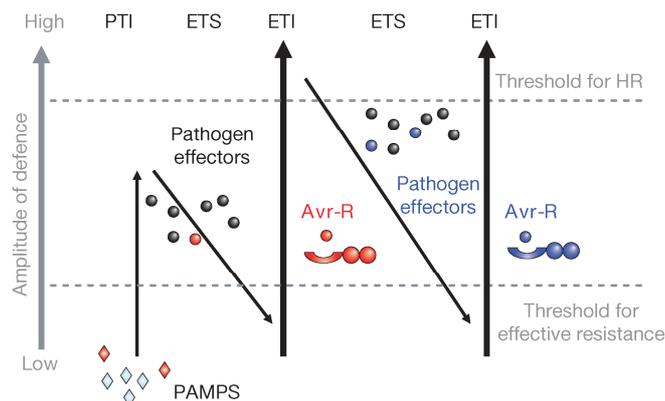
### **3.2. Reconnaissance hôte/agent pathogène**

Les notions de résistances non-hôte, verticale ou horizontale de la plante, d'agressivité et de virulence de l'agent pathogène, ont émergées à la suite d'expérimentations au champ, souvent réalisées dans le cadre de programmes d'amélioration ou d'études du déterminisme génétique de la résistance. Depuis, des travaux de biologie moléculaire et de génétique fonctionnelle ont permis de bien comprendre les mécanismes impliqués dans certains aspects de la résistance, en particulier les résistances non-hôte et verticale.

Lorsqu'un agent potentiellement pathogène, ayant franchi les barrières protectrices constitutives (cuticule, paroi pectocellulosique, etc.), entre en contact avec une plante dans des conditions d'environnement favorables à l'infection, débute alors un dialogue moléculaire entre l'hôte et le parasite dont l'issue va définir le type de relation qui va s'établir entre les protagonistes (Innes, 1996 ; Lepoivre, 2003).

La compatibilité ou l'incompatibilité de l'interaction plante/agent pathogène dépend de la capacité de la plante à identifier la présence de l'agresseur. L'évolution du règne végétal a conduit à la mise en place de deux niveaux de reconnaissance : le premier, qui correspond à la résistance non-hôte, utilise des récepteurs transmembranaires appelés Pattern Recognition

Receptors (PRRs) qui détectent des molécules communes à différents microorganismes pathogènes ou non (Pathogen ou Microorganism ou Danger-Associated Molecular Pattern, *i.e.* PAMPs ou MAMPs ou DAMPs), telle que la flagelline des bactéries ou l'ergostérol chez les champignons, ou encore les composés issus de la dégradation de la paroi végétale. Le second niveau, qui correspond à la résistance verticale, est basé sur les protéines codées par la plupart des gènes de résistance et permettant la reconnaissance d'effecteurs émis par l'agent pathogène (Jones et Dangl, 2006). Le modèle dit « en zigzag » (Fig. 13) décrit ces deux niveaux de la reconnaissance des agents pathogènes par les plantes.



**Figure 13 :** Modèle en zigzag illustrant les réponses quantitatives de résistance des plantes lors de la reconnaissance d'un agent pathogène (Jones et Dangl, 2006).

Dans la plupart des cas, les PAMPs sont reconnus par les PRRs de la plante, ce qui déclenche une réaction visant à empêcher la colonisation (PAMP-triggered immunity, ou PTI). Cette PTI aboutit à une incompatibilité et suffit à stopper le développement des organismes pathogènes pour la plupart des plantes : il s'agit de la résistance non-hôte.

Les agents pathogènes d'une espèce végétale donnée sont capables de contourner ou d'inhiber cette PTI, entre autres en déployant des effecteurs qui contribuent alors à leur virulence (Deslandes et Rivas, 2012). On parle d'une sensibilité provoquée par les effecteurs (effector-triggered susceptibility ou ETS). Un effecteur donné peut alors être spécifiquement reconnu par la protéine de résistance correspondante. Chez la plante, le résultat est une résistance déclenchée par les effecteurs (effector-triggered immunity ou ETI). L'ETI est une version accélérée et amplifiée de la PTI, et aboutit à une résistance totale (ou verticale).

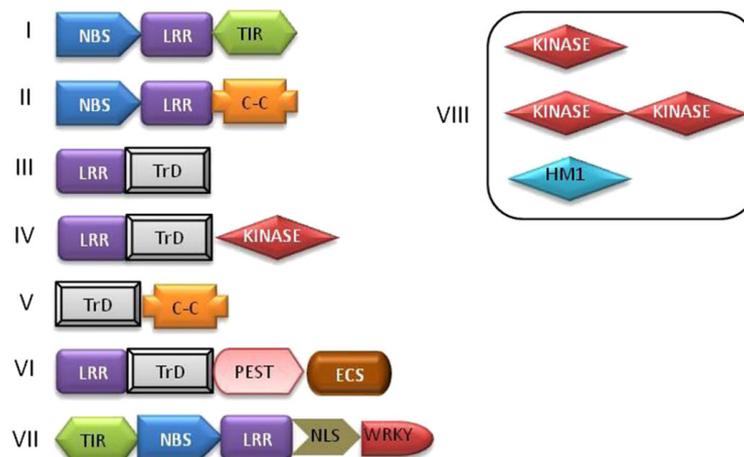
Dans une troisième phase, la sélection naturelle a conduit les agents pathogènes à éviter l'ETI en éliminant ou en diversifiant les gènes d'effecteurs identifiés, ou en acquérant des effecteurs supplémentaires qui suppriment l'ETI. La sélection naturelle a aussi comme conséquence de nouvelles spécificités de résistance conférées par de nouveaux allèles chez la plante, de sorte que l'ETI puisse être de nouveau déclenchée (Jones et Dangl, 2006). Ainsi, la coévolution des gènes R et des gènes Avr maintient, par la reconnaissance ou non entre leurs produits d'expression, une situation où la maladie est présente mais où certaines accessions lui résistent.

### 3.3. Derrière la résistance verticale : protéines de résistance et protéines d'avirulence

Le premier gène de résistance cloné a été celui de la résistance de la tomate à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (gène *Pto*) en 1993 (Martin *et al.*, 1993). Aujourd'hui, plus de 70 gènes R sont connus (Liu *et al.*, 2007 ; Gururani *et al.*, 2012). Malgré ce grand nombre et la diversité des parasites concernés (champignons, bactéries, virus), ceux-ci présentent une forte homologie de structure et la conservation d'un certain nombre de motifs structuraux (Lepoivre, 2003). Sur le plan fonctionnel, la plupart des gènes R combinent un motif récepteur (qui serait responsable de la reconnaissance des molécules élicitrices) et un domaine effecteur (qui serait responsable de l'activation directe ou indirecte des signaux de transduction).

Ainsi, cinq domaines structuraux sont particulièrement fréquents :

- le domaine LRR (Leucine-Rich Repeats) : ce domaine serait lié à la spécificité de l'interaction éliciteur/récepteur.
- le domaine sérine/thréonine kinase (Ser/Thr kinase), impliqué dans les réactions de phosphorylation associées à la transduction du signal.
- le domaine NBS (Nucleotide Binding Site) correspondant à un site de fixation et d'hydrolyse des nucléotides triphosphate ATP et GTP.
- le domaine CC (Coiled Coil) impliqué dans les interactions protéine-protéine.
- le domaine TIR (Toll Interleukin Receptor) serait impliqué dans la signalisation cellulaire.



**Figure 14** : Principales classes de gènes de résistance R chez les plantes, basées sur l'organisation de leurs domaines fonctionnels (Gururani *et al.*, 2012). LRR : Leucine Rich Repeats ; NBS : Nucleotide-Binding Site ; TIR : Toll-Interleukin-1 Receptors ; CC : Coiled Coil ; TrD : Transmembrane Domain ; PEST : Protein Degradation Domain (proline-glycine-serine-threonine) ; ECS : Endocytosis Cell Signaling domain ; NLS : Nuclear Localization Signal ; WRKY : Amino acid domain ; HMI : Helminthosporium carbonum toxin reductase enzyme.

Sur la base des différentes associations de ces domaines conservés, on distingue plusieurs classes de gènes R (Fig. 14). Au-delà de cette variété, on trouve une grande unité au niveau fonctionnel, avec un domaine récepteur (le plus souvent des LRR), un domaine central NBS (Belkhadir *et al.*, 2004 ; Buell, 1999 ; Toyoda *et al.*, 2002), et aussi très souvent des domaines liés à la transduction du signal, comme les domaines TIR, Coiled Coil ou kinase. Des exemples de gènes de résistance pour ces différentes classes sont donnés dans le tableau II.

**Tableau II :** Exemples de gènes de résistance R en fonction des différents domaines fonctionnels (d'après Gururani *et al.*, 2012).

Principales classes de gènes R		Domaines										Exemples
		LRR	NBS	TIR	Kinase	CC	TrD	PEST	ECS	NLS	WRKY	
I	NBS-LRR-TIR	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	<i>N, L6, RPP5</i>
II	NBS-LRR-CC	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>I2, RPS2, RPM1</i>
III	LRR-TrD	✓	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	<i>Cf-9, Cf-4, Cf-2</i>
IV	LRR-TrD-Kinase	✓	-	-	✓	-	✓	-	-	-	-	<i>Xa21</i>
V	TrD-CC	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-	<i>RPW8</i>
VI	TIR-NBS-LRR-NLS-WRKY	✓	✓	✓	-	-	-	-	✓	-	✓	<i>RRS1R</i>
VII	LRR-TrD-PEST-ECS	✓	-	-	-	-	✓	✓	✓	-	-	<i>Ve1, Ve2</i>
VIII	Enzymatic R-genes	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	<i>Pto, Rpg1</i>
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Hm1</i>

✓ = présent.

- = absent.

Les gènes d'avirulence codent pour des protéines appartenant à des familles très diverses, mais beaucoup d'entre elles présentent des caractéristiques communes dont une petite taille, leur sécrétion par l'agent pathogène, leur transfert fréquent vers le cytoplasme de la cellule hôte, etc. Lorsque le mode d'action de ces effecteurs au cours de l'interaction a pu être élucidé, deux rôles pour l'agent pathogène ont pu leur être donnés : ils suppriment la résistance basale et la résistance non-hôte, et ils modifient la physiologie de l'hôte d'une façon favorable pour le parasite (ex. transfert de nutriments) (Speth *et al.*, 2007).

La structure même des protéines de résistance montre que la résistance verticale (ou totale), est fortement liée à la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante et suggère que cette reconnaissance passe par celle des effecteurs : les gènes associés à cette résistance, codent le plus souvent pour des protéines qui participent à la reconnaissance de l'agent pathogène. En fonction du couple protéine de résistance/protéine d'avirulence, deux modèles différents rendent compte de leur interaction :

Dans le modèle le plus classique, dit « théorie moléculaire de la résistance » (Staskawicz *et al.*, 1995) ou « modèle du récepteur », une interaction directe et spécifique de la protéine de résistance avec la protéine d'avirulence correspondante, entraîne l'activation de la première, ce qui déclenche la cascade de signalisation menant aux réactions de défense de la plante. Le modèle du gardien (Guard hypothesis (Dangl et Jones, 2001)) a été formulé plus tard pour rendre compte de résultats contraires au modèle du récepteur. En particulier, dans certains couples protéine de résistance/protéine d'avirulence, l'interaction physique entre les deux

protéines ne semble pas avoir lieu (Luderer *et al.*, 2001). Dans ce modèle alternatif, l'effecteur agit sur une protéine cible en modifiant sa structure et c'est cette modification qui sera perçue par la protéine de résistance. Ceci permet aussi d'expliquer comment plusieurs effecteurs peuvent être reconnus par une même protéine de résistance R (Bonas et Lahaye, 2002 ; Vos *et al.*, 1998).

Bien que ce mécanisme de résistance par reconnaissance de l'agent pathogène puis le déclenchement d'une réaction de défense soit le plus étudié, il ne faut cependant pas oublier que d'autres types de gènes de résistance existent. Par exemple des gènes impliqués dans des résistances aux toxines produites par l'agent pathogène ont été mis en évidence, et seront présentés plus loin dans ce chapitre. Notons également l'existence de gènes de résistance récessifs (*mlo* chez l'orge (Lyngkjær *et al.*, 2000), *sbm1* chez le pois (Gao *et al.*, 2004)) qui ne permettent pas une reconnaissance de l'agent pathogène, mais qui provoquent une perte de cibles pour les effecteurs de ce dernier.

### 3.4. Mécanismes de défense

Pour se défendre des attaques d'agents pathogènes, les plantes disposent d'une grande variété de mécanismes de défense. Certains mécanismes sont constitutifs ; ils s'opposent passivement à l'invasion de la plante par l'agent pathogène. On peut citer dans cette catégorie les barrières physiques qui ralentissent la croissance de l'agent pathogène comme la cuticule et les phytoanticipines, des molécules présentes constitutivement dans la plante et toxiques pour l'agent pathogène.

Cependant, de nombreux autres mécanismes sont induits suite à l'infection. L'efficacité de la défense envers un agent pathogène dépend essentiellement de la rapidité et de l'ampleur de la réponse de la plante hôte. Cette réponse se met en place suite à la perception par la plante d'une attaque exogène, et est relayée par une cascade de signalisations intracellulaires aboutissant ainsi à l'induction des effecteurs de la défense.

#### 3.4.1. Transduction du signal

La détection de l'agent pathogène, via la détection de PAMPs (ou MAMPs, ou DAMPs) ou la reconnaissance d'effecteurs, est suivie par une étape de transduction du signal, menant à de multiples réponses de défense. Malgré la grande complexité de ces voies de transduction du signal (Fig. 15), trois grandes étapes peuvent être dégagées : (i) une activation précoce de gènes de défense, (ii) l'accumulation de phytohormones et (iii) l'activation de mécanismes de défense spécifiques par ces phytohormones, à la fois sur et autour du lieu d'infection.

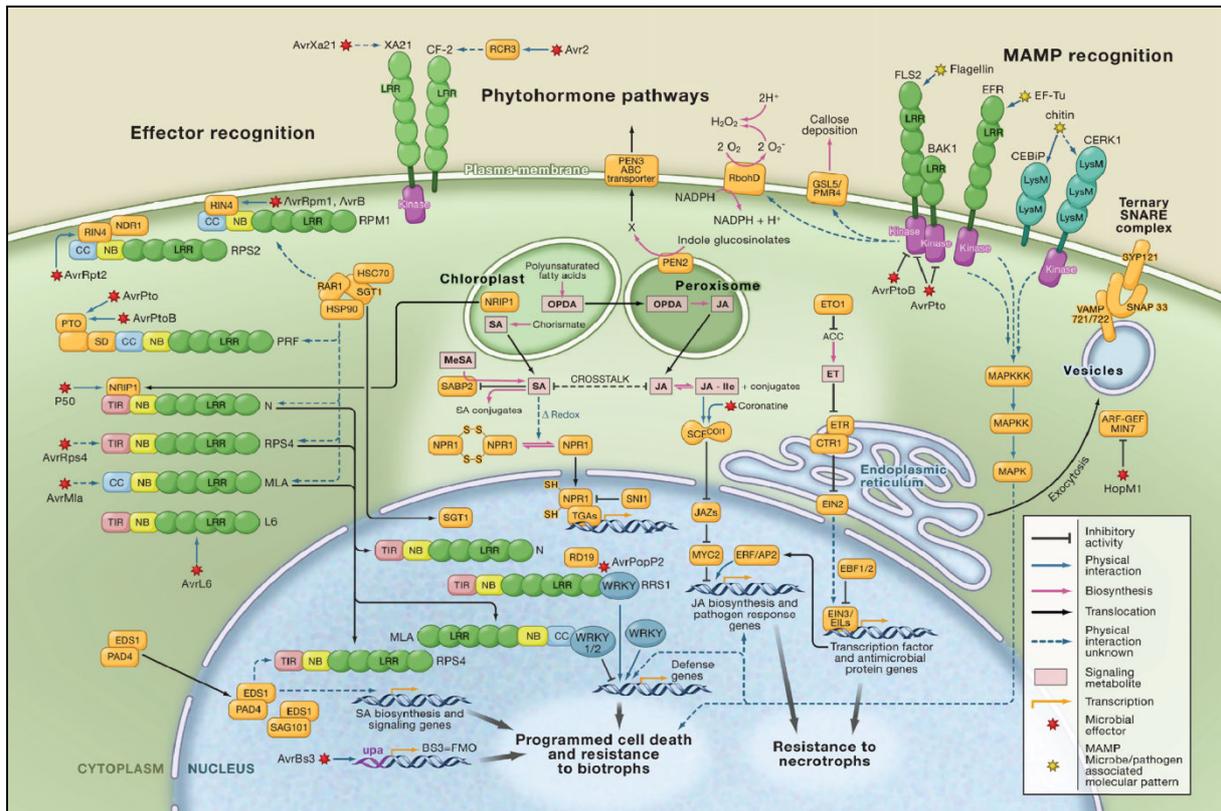


Figure 15 : Voies de signalisation des mécanismes de défense chez les plantes (Panstruga et al., 2009).

### 3.4.1.1. Activation précoce de gènes de défense

L'activation « directe » des gènes de défense, visibles à la fois chez la PTI et l'ETI, passe principalement (pour la PTI) par l'activation successive de MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase), aboutissant à l'activation transcriptionnelle de gènes de défense et parfois à la mort cellulaire programmée.

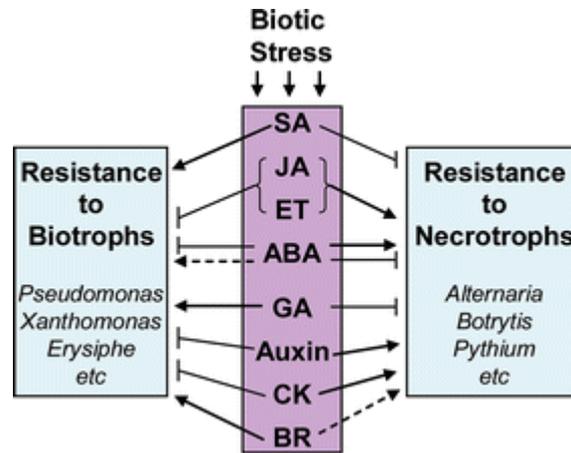
Dans le cas de l'ETI, les voies de transduction du signal connues sont plus diverses. On suppose que les protéines R à LRR extracytoplasmiques (comme Xa21 (Song *et al.*, 1995), ou les protéines Cf de la tomate (Wulff *et al.*, 2009)), avec leur structure proche de celle des PRR, ont un fonctionnement similaire à celles-ci.

Lorsqu'elles sont activées, les protéines R cytoplasmiques semblent migrer vers le noyau où elles participent à l'activation de gènes de défense, souvent *via* l'intervention de régulateurs transcriptionnels spécifiques incluant des membres de la superfamille des WRKY (Pandey et Somssich, 2009). Ce type de comportement a été montré à la fois chez les protéines CC-NBS-LRR et les TIR-NBS-LRR (Wirthmueller *et al.*, 2007).

### 3.4.1.2. Accumulation de phytohormones

L'activation des protéines R ou PRR aboutit aussi à l'accumulation de phytohormones (Davies, 2004 ; Thomma *et al.*, 2001). Parmi les nombreuses phytohormones (Fig 16) impliquées dans la résistance aux bioagresseurs (pour revue : Bari et Jones, 2009), trois d'entre elles sont le plus souvent citées : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et

l'éthylène (ET). Les voies de biosynthèse de ces phytohormones sont connues, mais les mécanismes de la régulation de leur accumulation le sont moins. De plus, ces hormones étant à la croisée de nombreux processus physiologiques, ces mécanismes ne sont probablement pas directement inféodés à l'interaction hôte-pathogène.



**Figure 16 :** Effet des phytohormones dans la résistance aux stress biotiques. SA : acide salicylique ; JA : acide jasmonique ; ET : éthylène ; ABA : acide abscissique ; GA : acide gibbérellique ; CK : cytokinine ; BR : brassinostéroïde (Bari et Jones, 2009).

Ces phytohormones sont à la croisée de voies de défenses qui ont pris leur nom : la voie de l'acide salicylique, la voie de l'acide jasmonique et la voie de l'éthylène (Fig. 15). Elles correspondent à des cascades d'induction qui n'activent pas les mêmes gènes de défense (Spoel et Dong, 2008). Pour simplifier, la voie de l'acide salicylique intervient dans la réponse de la plante hôte à des agents pathogènes de type biotrophe, tandis que la voie de l'acide jasmonique intervient dans la réponse aux agents pathogènes de type nécrotrophe. La voie de l'éthylène est activée par des blessures, qu'elles soient d'origine abiotique ou dues à des ravageurs, mais une activation réciproque existe entre les voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique (Glazebrook, 2005 ; Hammerschmidt et Smith-Becker, 1999 ; Łaźniewska *et al.*, 2010). En conséquence, la voie de l'éthylène est aussi impliquée dans les réactions de défense face aux agents pathogènes nécrotrophes.

### 3.4.1.3. La voie de l'acide salicylique

L'acide salicylique est au cœur des mécanismes classiques de l'incompatibilité (pour revue : Loake et Grant, 2007), aboutissant au déclenchement de la réaction hypersensible (HR) et de la résistance systémique acquise (SAR).

L'application d'acide salicylique et de ses dérivés sur une plante provoque l'accumulation de PR protéines. Les mutants affectés dans la perception et/ou la synthèse de l'acide salicylique sont plus sensibles aux agents pathogènes, virulents comme avirulents.

La synthèse de l'acide salicylique provoquée par les agents pathogènes se fait dans le chloroplaste (Strawn *et al.*, 2007), à partir du chorismate, via l'action de l'enzyme isochorismate synthase, codée par *ICS1*. Le gène *ICS1* est fortement activé lors de la détection

d'un agent pathogène (Truman *et al.*, 2006). L'acide salicylique est ensuite susceptible d'être méthylé (Huang *et al.*, 2003) ce qui l'inactive, mais rend possible son accumulation et son transport vers d'autres organes, l'un des mécanismes expliquant la SAR. Le SA peut aussi être conjugué avec un acide aminé (Nobuta *et al.*, 2007), cette forme étant indispensable à l'activation de NPR1.

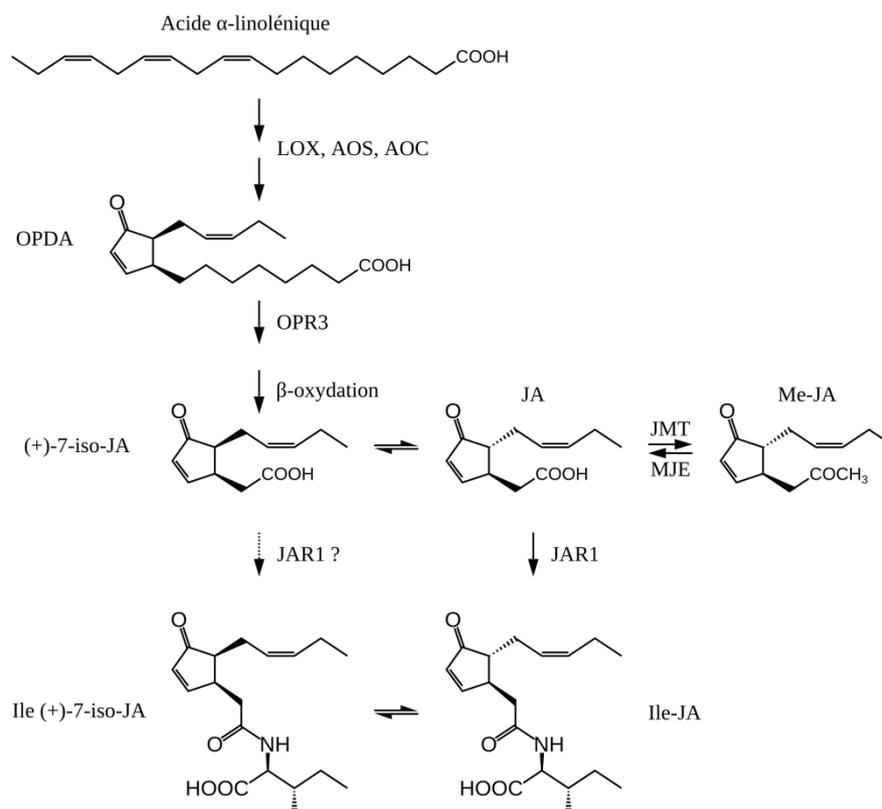
Le facteur de transcription NPR1 est une protéine centrale dans la résistance systémique acquise, mais aussi dans tous les mécanismes de résistance impliquant l'acide salicylique (Dong, 2004 ; Mukhtar *et al.*, 2009). Les mutants déficients pour NPR1 présentent le même phénotype de sensibilité que ceux affectés dans la synthèse de l'acide salicylique. En fait, en recherchant au hasard des mutants sensibles aux agents pathogènes biotrophes, on tombe le plus souvent sur NPR1 (pour exemple : Cao *et al.*, 1994 ; Delaney *et al.*, 1995 ; Glazebrook *et al.*, 1996).

En l'absence d'agent pathogène, NPR1 est présent dans la cellule sous la forme d'oligomères dont les unités sont liées par des liaisons disulfures. L'acide salicylique interagit directement et physiquement avec NPR1 (Wu *et al.*, 2012), ce qui aboutit à la décomposition de l'oligomère en NPR1 monomérique via l'action de thiorédoxines (Mou *et al.*, 2003). NPR1 migre alors vers le noyau où il joue un rôle d'activateur transcriptionnel en interagissant avec les facteurs de transcription TGA (Kesarwani *et al.*, 2007). Les gènes de défense, comme *PRI*, dont l'expression est induite par la voie de l'acide salicylique sont ainsi induits lorsque la concentration en NPR1 augmente dans le noyau.

#### 3.4.1.4. La voie des jasmonates

La voie des jasmonates (ou voie de l'acide jasmonique) nous intéresse plus particulièrement ici car *A. dauci* est un agent pathogène nécrotrophe. L'acide jasmonique a, pour la première fois, été relié à la réponse de défense par les travaux de Farmer et Ryan (Farmer et Ryan, 1990 ; Farmer et Ryan, 1992). L'acide jasmonique et ses dérivés (Fig. 17) contrôlent différents aspects du développement des plantes en réponse aux stimuli extérieurs. Ils jouent notamment un rôle dans la sénescence, la maturation des organes floraux mâles, la réponse aux blessures et à l'infection par certains agents pathogènes (Balbi et Devoto, 2008 ; Koo et Howe, 2009 ; Wasternack, 2007).

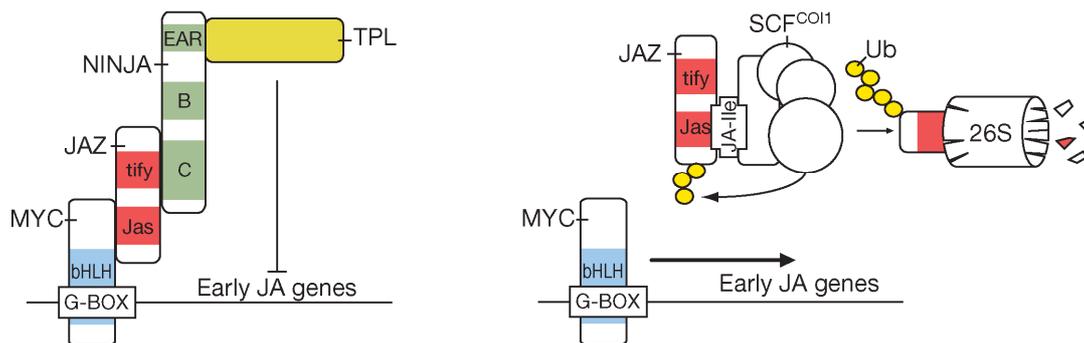
Les jasmonates (pour revue : Fonseca *et al.*, 2009b) sont des acides gras oxygénés qui sont formés à partir de l'acide linoléique libéré des membranes des chloroplastes par des lipases. Leur synthèse commence dans les plastes puis se poursuit dans le peroxyosome. Dans les plastes, l'acide linoléique est oxygéné par des lipoxgénases (LOXs) en des dérivés hydroperoxydes. Ces dérivés sont ensuite pris en charge par une allène oxyde synthase (AOS) puis par une allène oxyde cyclase (AOC) pour former l'acide 12-oxo-phytyldiénoïque (OPDA). L'OPDA migre ensuite vers le peroxyosome. Là, il subit d'abord une réduction catalysée par OPR3, puis subit trois cycles d' $\alpha$ -oxydation donnant de l'acide (+)-7-iso-jasmonique ((+)-7-iso-JA) qui s'épimérise en acide jasmonique, cette dernière réaction étant réversible.



**Figure 17 :** La voie des jasmonates : Biosynthèse et modifications de l'acide jasmonique (figure simplifiée d'après Fonseca et al. (2009b)).

L'acide jasmonique peut être métabolisé en plusieurs dérivés, les mieux caractérisés étant le méthyl-jasmonate (MeJA), l'Isoleucine-jasmonate (JA-Ile) et l'isoleucine-(+)-7-iso-jasmonate. L'enzyme JMT catalyse la méthylation de l'acide jasmonique en MeJA. Le MeJA, extrêmement volatil, serait impliqué dans une communication plante à plante. Il n'est pas directement bioactif, mais il peut être converti à nouveau en acide jasmonique par l'enzyme MJE. L'enzyme JAR1 catalyse la synthèse de JA-Ile à partir de JA et peut être aussi celle de (+)-7-iso-JA-Ile à partir de (+)-7-iso-JA. Chez *Arabidopsis*, il a été montré que la forme (+)-7-iso-JA-Ile est la seule à être directement bioactive dans les cellules (Fonseca *et al.*, 2009a).

Les jasmonates contrôlent la transcription de gènes de défense *via* le facteur de transcription MYC (Pauwels *et al.*, 2010). En l'absence de jasmonates, le facteur MYC interagit avec le domaine 'Jas' des protéines JAZ (JASMONATE ZIM DOMAIN) qui interagissent elles-mêmes par leur motif 'tify' avec le domaine 'C' du facteur NINJA. Le motif 'EAR' de NINJA est essentiel pour l'interaction avec les corépresseurs TPL (TOPLESS). En absence de jasmonates actifs, l'édifice est stable et les gènes ne sont pas exprimés (Fig. 18).



**Figure 18 :** Modèle de fonctionnement général de l'activation de l'expression des gènes liés aux jasmonates. En l'absence de jasmonates, le facteur MYC interagit avec le domaine 'Jas' des protéines JAZ. En présence de (+)-7-iso-JA-Ile, les protéines JAZ interagissent cette fois avec l'ubiquitine ligase SCF<sup>COI1</sup>, menant à la dégradation protéasomale de JAZ, au dégagement du facteur MYC et à l'activation de l'expression des gènes liés aux jasmonates (figure simplifiée d'après Pauwels et al., 2010).

L'analyse génétique du mutant *coi1* (coronatine-insensitive 1) a permis de mettre en évidence le rôle important joué par *COI1* dans la voie des jasmonates. Des mutations de ce gène entraînent une résistance à l'inhibition par le JA de la croissance racinaire, différents degrés de stérilité mâle et une susceptibilité accrue à certains pathogènes nécrotrophes. *COI1* est une protéine possédant une F-box et déterminant la spécificité de cible du complexe E3 ubiquitine ligase SCF<sup>COI1</sup> qui va marquer certaines protéines destinées à être dégradées par le protéasome. Des analyses génétiques indiquent que ce complexe est requis pour la plupart des processus de signalisation par les jasmonates (Feys *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 2004b ; Xie *et al.*, 1998).

En présence de JA-Ile, la F-box de la protéine CORONATINE-INSENSITIVE 1 (*COI1*) se lie avec le JA-Ile, puis l'ubiquitine ligase SCF<sup>COI1</sup>, ce qui déclenche l'ubiquitination de JAZ, laquelle entraîne sa dégradation par le protéasome. L'absence de JAZ permet l'activation des gènes contrôlés par l'acide jasmonique (Ballaré, 2011 ; Kazan et Manners, 2012).

En plus de l'activation locale de la cascade de signalisation par les jasmonates, on observe une augmentation du niveau général de résistance comparable à la SAR. Certains jasmonates (comme le MeJA) joueraient donc le rôle de molécules signal qui, propagées de façon systémique afin d'induire des réponses dans d'autres organes non directement affectés par l'infection primaire, apportent ainsi une protection contre de futures attaques.

### 3.4.1.5. Interaction entre ces deux voies

Les mécanismes par lesquels les phytohormones agissent sont complexes, leurs voies de transduction de signal ne sont pas linéaires et indépendantes, elles s'entrecroisent pour former des interactions et des synergies complexes (Spoel et Dong, 2008 ; Thaler *et al.*, 2002 ; Bari et Jones, 2009). En ce qui concerne les jasmonates (JA) et l'acide salicylique (SA), plusieurs niveaux d'interaction existent.

À forte concentration de ces phytohormones, la majorité de ces interactions sont négatives. Ainsi, MPK4 (mitogen-activated protein kinase 4) active la voie du JA et inhibe la

voie du SA (Brodersen *et al.*, 2006). Parallèlement, la glutarédoxine GXR480 (Ndamukong *et al.*, 2007) et le facteur de transcription WRKY70 (Li *et al.*, 2004a ; Li *et al.*, 2006) sont activés par le SA et inhibent les gènes de la voie du JA. Inversement, les facteurs de transcription MYC2 (Laurie-Berry *et al.*, 2006) et WRKY53 (Miao et Zentgraf, 2007) sont activés par le JA et inhibent l'expression de gènes sous le contrôle de SA. De façon plus complexe, l'expression du facteur de transcription WRKY62, qui inhibe les gènes de la voie du JA, nécessite la présence simultanée de JA et de SA (Mao *et al.*, 2007).

À plus faible concentration, on observe des effets agonistes, dont les mécanismes ne sont pas encore bien connus. Ces mécanismes reprennent cependant les voies de transduction du signal déjà mises en évidence, car NPR1 et COI1 sont tous les deux requis pour que cette interaction positive ait lieu (Mur *et al.*, 2006). Ces résultats, combinés avec ceux de Truman *et al.* (2007), laissent à penser que les voies du JA et du SA, si elles sont clairement antagonistes à l'échelle cellulaire, sont peut-être bien agonistes à de plus grandes échelles de distance et de temps, échelles qui induisent, par effet de dilution, de plus faibles concentrations.

### **3.4.2. Mécanismes de défense induits**

#### **3.4.2.1. La réaction hypersensible (HR)**

Fortement liée à la voie de l'acide salicylique, la HR se caractérise par une réaction nécrotique qui se manifeste précocement chez des plantes résistantes. Étant donné les analogies entre cette réaction et les phénomènes d'apoptose chez le règne animal, on parle dans la HR de mort cellulaire programmée (Programmed Cell Death ou PCD). La HR débute par un burst oxydatif caractérisé par une production importante de formes actives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS). Ce mécanisme permet à la plante de limiter la progression de l'agent pathogène car ces composés sont toxiques. Les ROS, et en particulier parmi eux l'oxyde nitrique (NO), auraient aussi un rôle de signalisation chez les végétaux (Grayer et Kokubun, 2001 ; Laloi *et al.*, 2004 ; Mittler *et al.*, 2011 ; Delledonne *et al.*, 1998), et déclencheraient l'activation d'autres réponses de défense.

L'effet de cette HR est de bloquer l'invasion des agents pathogènes au niveau de la zone infectée en les privant de source de nutriments par l'intermédiaire de la mort cellulaire (Pontier *et al.*, 1998 ; Łażniewska *et al.*, 2010). Ce type de résistance est efficace contre les agents pathogènes qui ne peuvent vivre que sur des tissus vivants de l'hôte (biotrophes obligatoires), ou des agents pathogènes hémibiotrophes, mais pas contre ceux qui tuent les tissus de l'hôte durant l'infection (nécotrophes) (Glazebrook, 2005 ; Jones et Dangl, 2006).

#### **3.4.2.2. Les PR protéines**

La transduction des signaux de défense aboutit à la surexpression de gènes codant directement pour des protéines inhibant le développement de l'agent pathogène, et généralement regroupées sous l'appellation de protéines liées à la pathogenèse (Pathogenesis-Related proteins, PR proteins, ou protéines PR). Ainsi, l'expression de chaque protéine PR

peut être induite par les jasmonates, l'acide salicylique, ou parfois ces deux molécules. Au-delà de la réaction de défense au niveau du point d'infection, ce contrôle permet aussi l'activation à distance des PR protéines qui ainsi, participent à la SAR. Ces protéines peuvent être classées parmi différentes familles en fonction de leur structure ou de leur mode d'action, lorsqu'il est connu (Tab. III). Dans certains cas, la voie (du SA ou du JA) contrôlant l'expression est elle aussi connue chez *A. thaliana* (Thomma *et al.*, 2001), mais ce trait semble parfois varier d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez le tabac, les différents membres d'une même famille de protéines PR peuvent être régulés différemment (Niki *et al.*, 1998 ; Seo *et al.*, 2001b).

**Tableau III** : Propriétés des différentes familles de protéines PR (van Loon *et al.*, 2006).

<i>Famille</i>	<i>Propriétés</i>	<i>Contrôle</i>
PR-1	inconnu	SA
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase	SA
PR-3	Chitinase type I, II, IV, V, VI, et VII	JA
PR-4	Chitinase type I, II	JA
PR-5	Thaumatococcus-like	SA
PR-6	Inhibiteur de protéinase	JA
PR-7	Endoprotéinase	SA et ET
PR-8	Chitinase type III	SA et JA
PR-9	Péroxydase	
PR-10	Ribonuclease-like	JA
PR-11	Chitinase type I	
PR-12	Défensine	JA
PR-13	Thionine	JA
PR-14	Protéines de transfert de lipides	
PR-15	Oxalate oxidase	
PR-16	Oxalate-oxidase-like	
PR-17	inconnu	

Parmi ces protéines PR certaines sont connus pour être exprimées lors de l'interaction entre une plante et un champignon, citons par exemple :

- Les chitinases (PR-3, PR-4, PR-11) : enzymes digestives capables d'hydrolyser les ponts glycosidiques de la chitine, un des principaux constituants de la paroi fongique.
- Les défensines (PR-12) : une famille de petits peptides riches en cystéines à activité antimicrobienne et antifongique à spectre large (Lay et Anderson, 2005). Le mode d'action des défensines n'est pas parfaitement connu, il semble lié à des perturbations membranaires de leurs cibles, en particulier une perte de contrôle des flux ioniques. Le

genre *Alternaria* (Penninckx *et al.*, 1996) fait partie des nombreux agents pathogènes sensibles aux défensines.

- Les thionines (PR-13). Malgré une structure différente, elles aussi présentent une activité antimicrobienne à spectre large basée sur une perméabilisation des membranes (Florack et Stiekema, 1994). Les thionines sont majoritairement vacuolaires : elles sont supposées agir sur l'agent pathogène après la mort des cellules végétales (Thevissen *et al.*, 1996).

Les protéines PR sont également parfois exprimées, sous le contrôle de ces mêmes voies, en l'absence d'agent pathogène, et à des niveaux étonnamment élevés. Ainsi sont-elles impliquées dans les processus de sénescence foliaire (Quirino *et al.*, 2000) et de maturation des fruits. Un exemple spectaculaire est celui de la vigne : la concentration en protéines PR dans les baies de raisins à maturité est telle qu'elle nuit à la transparence des vins (Ferreira *et al.*, 2004 *in* van Loon *et al.*, 2006). On les retrouve aussi parmi les gènes induits en réaction à des stress abiotiques comme les blessures, les métaux lourds, ou le froid. En effet, certaines protéines PR jouent un rôle antigél. Leur expression est d'ailleurs liée à la capacité de certaines espèces végétales à résister au froid (Griffith et Yaish, 2004).

#### 3.4.2.3. Autres protéines de défense

D'autres gènes impliqués dans les mécanismes de défense sont liés à la voie de l'acide jasmonique. Parmi eux, on peut citer les gènes codant pour la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) et les Germin-Like Protein (GLP).

- Les GLP (pour revue : Breen et Bellgard, 2010) sont caractérisées par un domaine cupine encadré par deux motifs conservés propres à cette famille (Germin-1 et Germin-2). Cette famille de protéines est impliquée dans de nombreux processus de résistance aux stress, dont la défense contre les agents pathogènes. En effet, les gènes codants pour ces protéines sont surexprimés dans de nombreux cas d'interactions plante/agent pathogène (11 références différentes *in* Breen et Bellgard, 2010), nuisant ainsi au développement de l'agent pathogène. Le mode d'action des GLP semble lié à leurs activités enzymatiques oxalate oxydase et sodium oxyde dismutase, qui participent au burst oxydatif.

- La PAL est la première enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes à partir de la phénylalanine. De nombreux composés sont synthétisés *via* cette voie, dont la lignine, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes et de nombreuses phytoalexines. D'ailleurs, les jasmonates induisent la synthèse de nombreuses phytoalexines dans différentes interactions plante/agent pathogène (Ahuja *et al.*, 2012). Dans le cas de la carotte, le rôle de la PAL a été mis en évidence lors de l'interaction incompatible avec *Pythium aphanidermatum* (Koch *et al.*, 1998).

#### 3.4.2.4. Les phytoalexines

Le terme phytoalexines désigne des molécules dont la synthèse est induite chez les végétaux en réponse à différents facteurs de stress (biotiques ou abiotique) et qui possèdent un

pouvoir inhibiteur à l'égard d'un large éventail de microorganismes. On peut les considérer comme symétriques des toxines fongiques : comme ces dernières, ce sont de petites molécules toxiques issues du métabolisme secondaire, mais à l'inverse de celles-ci, elles sont produites par la plante et toxiques pour l'agent pathogène. Elles sont impliqués dans l'altération de l'intégrité des membranes plasmiques fongiques, mais ne sont pas spécifiques dans leur activité anti-fongique (Morrissey et Osbourn, 1999).

Les phytoalexines sont absentes des tissus sains et sont certainement le résultat de la synthèse par des enzymes synthétisées *de novo* en réponse à l'infection (Morrissey et Osbourn, 1999). Cette réponse de défense est l'une des plus rapides observées chez les plantes suite à une infection. Le caractère inductible des phytoalexines les distingue donc des molécules toxiques constitutives appelées phytoanticipines (Grayer et Kokubun, 2001).

Dans les interactions plante hôte/agent pathogène, il apparait que la relation incompatible est généralement associée à la synthèse rapide de phytoalexines qui atteindraient une concentration élevée susceptible d'arrêter la progression du parasite inducteur. La réaction compatible quant à elle, résulterait soit d'une accumulation plus lente des phytoalexines, aboutissant à une concentration finale insuffisante (pouvant notamment résulter de sa détoxification par l'agent pathogène), soit de la tolérance de souches fongiques vis-à-vis de cette phytoalexine.

### **3.5. Résistance aux toxines**

De nombreux agents pathogènes, hémibiotrophes ou nécrotrophes, produisent des toxines, petites molécules issues du métabolisme secondaire et provoquant la mort cellulaire. Ainsi, certains agents pathogènes utilisent la mort cellulaire à leur avantage. En sécrétant des toxines capables de tuer les cellules des plantes hôtes sensibles, ils sont capables d'infecter, de coloniser et de se nourrir de leur hôte. Dans ce cas, la mort cellulaire est associée à la sensibilité de la plante et la résistance correspond au contraire à l'insensibilité aux effets de la toxine. Dans la plupart des cas, l'application de toxines purifiées sur la plante est suffisante pour reproduire les symptômes causés par l'agent pathogène (Lepoivre, 2003).

Le clonage de gènes de résistance qualitative à des agents pathogènes nécrotrophes a mené à la découverte de mécanismes de résistances aux toxines produites par ces agents pathogènes. Dans ce cadre, l'étude de deux interactions plante/agent pathogène a permis de mettre en évidence la diversité des modes de résistance aux toxines, qui incluent en particulier la détoxification et le contournement métabolique.

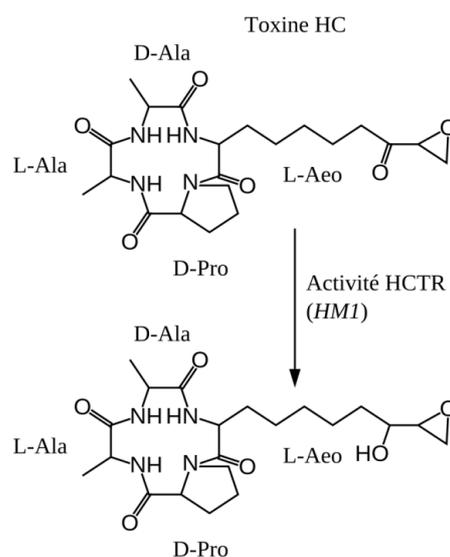
### 3.5.1. Détoxification : l'interaction maïs/*Cochliobolus carbonum* race 1

*Cochliobolus carbonum* est un agent pathogène responsable de l'helminthosporiose du maïs. Dans l'écrasante majorité des cas (Multani *et al.*, 1998), il s'agit d'un agent pathogène secondaire produisant des symptômes légers (Jones et Dunkle, 1993). Cependant, la race 1 de cet agent pathogène est capable de provoquer, sur des individus homozygotes récessifs pour le gène *hml*, l'une des maladies les plus dévastatrices sur plantes cultivées (Walton, 2006).

La mise en culture des premières variétés de maïs hybrides, homozygotes récessives, dans les années 1930 aux États-Unis, a provoqué l'expansion de cette forme extrême de la maladie, décrite pour la première fois en 1938 (Ullstrup, 1941 *in* Walton, 2006). L'effort de lutte génétique entrepris a alors permis la redécouverte de l'allèle dominant *Hml*, et la description du mécanisme de la résistance conférée par ce gène.

Le pouvoir pathogène particulier de la race 1 de *C. carbonum* est dû à la production d'une toxine, la HC-toxine, un térapeptide cyclique de formule cyclo (D-Pro-L-Ala-D-Ala-L-Aeo), avec Aeo pour acide 2-amino-9,10-époxy-8-oxodécanoïque (Fig.19 ; pour revue : Walton, 2006). La HC-toxine a une activité inhibitrice des déacétylases d'histones (HDAC, Brosch *et al.*, 1995). Utilisée seule, cette toxine n'est pas directement mortelle pour les cellules, bien qu'elle bloque leur division. En bloquant la déacétylation des histones, et donc la décondensation de la chromatine, on suppose qu'elle perturbe l'expression génique, et en particulier celle de gènes de défense.

L'allèle dominant de *Hml* code pour une réductase (Johal et Briggs, 1992) qui transforme une fonction carbonyle du groupe Aeo de la HC-toxine en une fonction alcool (activité HCTR, Fig. 19). Cette réduction aboutit à une diminution de la toxicité d'un facteur 100, un facteur qui n'est pas si important parmi les systèmes de détoxification, mais semble suffisant pour contrer le pouvoir pathogène de la race 1 de *C. carbonum*.

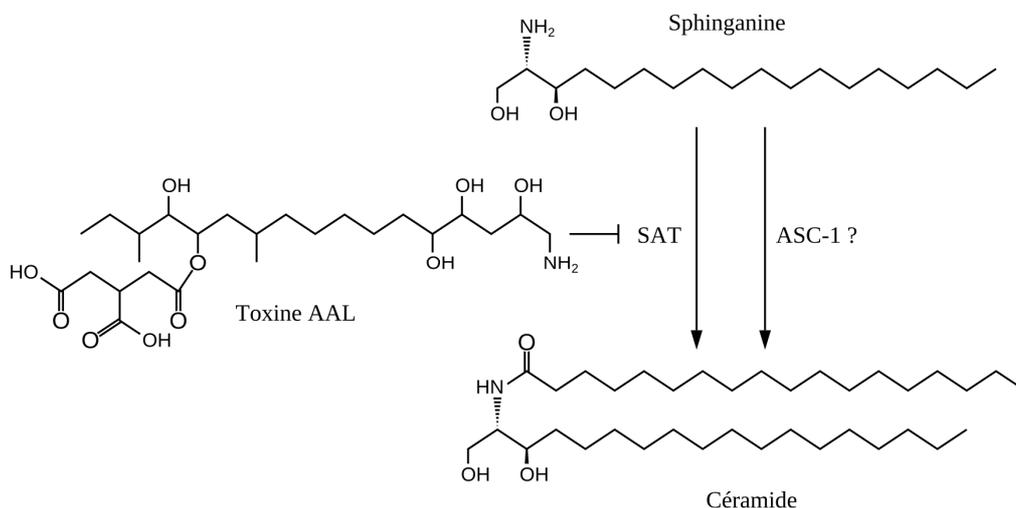


**Figure 19 :** Structure moléculaire de la toxine HC produite par *C. carbonum*, et de sa forme réduite, induite par l'activité HCTR conférée par *Hml* (Johal et Briggs, 1992 ; Walton, 2006).

Au-delà du simple exemple de cette interaction maïs/*C. carbonum*, les HDAC sont la cible de différents inhibiteurs dans divers couples hôte/pathogène. Parmi ces inhibiteurs, on peut citer l'apicidine produite par des souches de *Fusarium* spp. contaminant des semences de soja (Park *et al.*, 1999), la dépuécine d'*Alternaria brassicicola* (Wight *et al.*, 2009), ou la toxine Cyl-2 de *Cylindrocladium scoparium* (champignon pathogène, entre autres, sur rosier). De plus, des gènes orthologues de *Hml* existent chez la majorité des Poacées (Multani *et al.*, 1998) et leur disruption chez l'orge a rendu la plante sensible à *C. carbonum* (Sindhu *et al.*, 2008).

### 3.5.2. Contournement métabolique : l'interaction tomate/*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*

*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* est un agent pathogène nécrotrophe de la tomate. Son pouvoir pathogène dépend de la production d'un ensemble de toxines, nommées AAL (Fig. 20), et appartenant à la classe des homologues de la sphinganine (Akamatsu *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1996). De par leur structure, les toxines AAL inhibent l'activité de la sphinganine N-acyltransférase (SAT), une enzyme clef dans la voie des sphingolipides, qui permet la synthèse des céramides à partir de sphinganine. Ce blocage induit une accumulation de la sphinganine et de ses dérivés, collectivement nommés bases sphingoïdes libres, qui elles-mêmes semblent induire une mort programmée de la cellule, via les voies des jasmonates et de l'éthylène (Zhang *et al.*, 2001).



**Figure 20 :** Structures moléculaires de la sphinganine, du céramide et de la toxine AAL  $T_{A1}$ . SAT : Sphinganine N-acyltransférase ; ASC1 : protéine codée par le gène Asc-1. Il existe 12 toxines AAL répertoriées à ce jour, et ayant des structures très proches les unes des autres. La toxine AAL  $T_{A1}$  est l'une des plus bioactives. Pour review sur ces structures, voir : Winter *et al.*, 1996.

L'étude de lignées résistantes à la maladie a permis la caractérisation d'un gène, *Asc-1*

(Brandwagt *et al.*, 2000), conférant une résistance totale à la maladie. Ce gène confère aussi la résistance aux toxines AAL, les plantes sensibles développant, en présence des toxines, des symptômes similaires à ceux produits par *A. alternata* f. sp. *lycopersici*. Ce gène est homologue aux gènes *LAC1* et *LAG1* de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chez la levure, l'expression de ces gènes permet la synthèse de céramides à partir de sphinganine (Guillas *et al.*, 2001). Bien que la protéine codée par *Asc-1* n'ait aucune homologie de structure avec SAT, elle présenterait donc une activité similaire, mais est insensible à l'inhibition par les toxines AAL. La résistance de la tomate face à *A. alternata* f. sp. *lycopersici* serait donc basée sur un contournement métabolique (Spassieva *et al.*, 2002).

### 3.6. Derrière la résistance horizontale : des mécanismes divers et mal connus

Nous avons vu plus haut les caractéristiques de la résistance horizontale (partielle, et non différentielle) et de son déterminisme génétique (polygénique), qui sont comme symétriques de ceux de la résistance verticale. Son large spectre lui donne un grand intérêt économique qui justifie les nombreuses études engagées sur son sujet, mais ses caractères partielle et polygénique rendent difficile ces études : la résistance étant partielle, il faut quantifier la gravité de la maladie ; la résistance étant polygénique, il faut séparer différents QRLs (pour Quantitative Resistance Locus, ou QTLs de résistance) agissant ensemble sur le niveau de résistance final. En conséquence, les connaissances actuelles sur les mécanismes de cette résistance sont encore très parcellaires et plus souvent basées sur des inférences que sur des démonstrations. Une très bonne synthèse sur ce sujet a été proposée par Poland *et al.* en 2009. Nous nous baserons sur celle-ci, et sur des résultats présentés depuis.

Poland et ses collègues classent les mécanismes possibles de résistance partielle en six catégories :

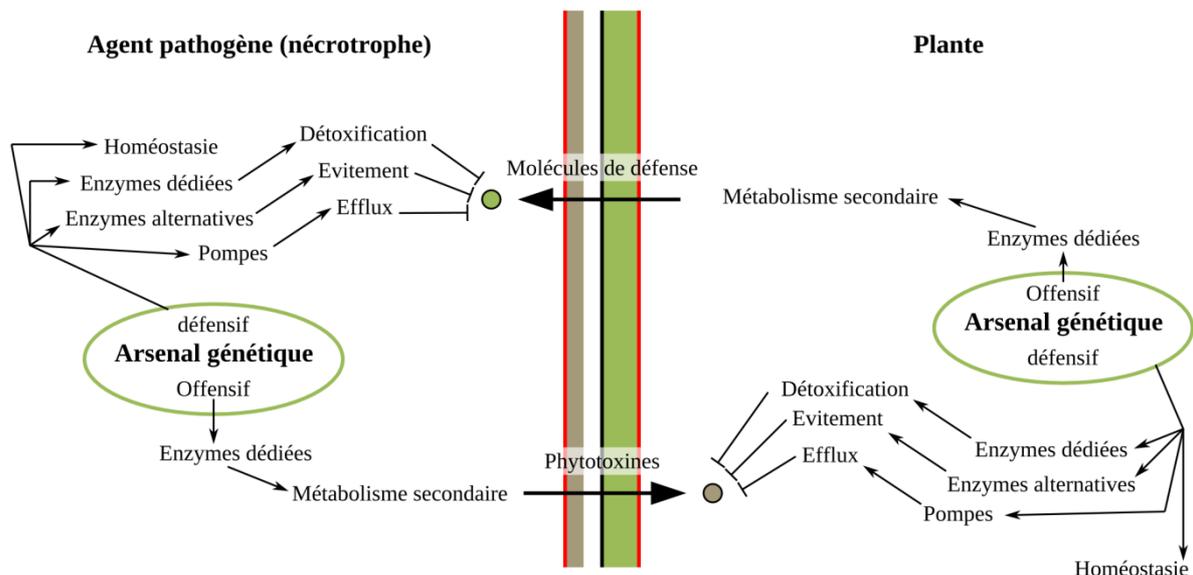
1. Ceux impliquant des aspects morphologiques et de développement
2. Ceux liés à la défense basale
3. Ceux liés à la guerre chimique
4. Ceux liés à la transduction du signal de défense
5. Ceux liés à une forme faible de la résistance verticale
6. Les nouveaux mécanismes

Les liens entre morphologie et résistance partielle sont connus depuis longtemps dans différentes interactions (au niveau microscopique (Melotto *et al.*, 2006) ou au niveau macroscopique (Albar *et al.*, 1998)). Il semble donc probable que les gènes impliqués dans ces aspects de la biologie de la plante aient des influences en termes de résistance partielle.

On retrouve aussi des liens entre développement et résistance partielle. Ainsi, on constate souvent une plus grande résistance des variétés à floraison tardive face aux agents pathogènes nécrotrophes (Collins *et al.*, 1999).

En ce qui concerne la défense basale, il n'existe pas à l'heure actuelle de lien direct entre elle et les QRLs. Une ligne de raisonnement permet cependant de faire le lien : d'une part, certaines lignées d'*Arabidopsis* mutantes pour des gènes impliqués dans la défense basale présentent une sensibilité accrue (comme pour *FLS2* (Zipfel *et al.*, 2004)). D'autre part, on observe une diversité dans ces gènes au sein d'espèces cultivées (Dunning *et al.*, 2007). Ainsi, un lien est possible entre cette diversité de séquence et une diversité du niveau de résistance.

On appelle « guerre chimique » l'échange de métabolites secondaires entre l'agent pathogène et son hôte (Fig. 21). L'agent pathogène produit des toxines que la plante peut combattre de différentes manières (cf. § 3.5.). En retour, la plante peut produire des molécules de défense, que l'agent pathogène peut également combattre à son tour (cf. § 3.4.2.).



**Figure 21 :** Le concept de guerre chimique. Il y a une très grande symétrie dans les interactions hôte/pathogène impliquant des métabolites secondaires. Chaque adversaire peut produire des métabolites secondaires en fonction de son « arsenal génétique », et symétriquement peut résister aux métabolites secondaires produits par son adversaire via différentes voies métaboliques.

Le lien entre la guerre chimique et les QRLs peut prendre deux formes : les QRLs correspondent à la production par la plante de molécules de défense plus efficaces ou en plus grande quantité, ou alors, ils correspondent à un mécanisme de résistance face aux toxines fongiques plus efficace. Les liens les plus convaincants entre QRL et guerre chimique mis au jour à l'heure actuelle concernent la production de phytoalexines (corrélation concentration en camalexine et résistance partielle dans l'interaction *A. thaliana/Botrytis cinerera*) et l'homéostasie (colocalisation des gènes de la glutathion S-transférase et de QRLs à spectre

large chez le riz (Wisser *et al.*, 2005)). À l'heure actuelle, aucune preuve de lien n'existe entre l'observation de QRLs et des mécanismes de détoxification. Cependant, l'insertion par transgénèse d'enzymes dégradant des toxines fongiques peut induire des résistances partielles. Ainsi, entre autres exemples, des tomates produisant de l'oxalate oxydase de blé présentent un fort niveau de résistance partielle face à *B. cinerea* (Walz *et al.*, 2008 ; en particulier la Fig. 3 montrant l'aspect partiel de la résistance).

On peut élargir cette notion de guerre chimique aux protéines végétales inhibant le développement de l'agent pathogène, comme les PR protéines et autres protéines induites par les voies de défense. Dans ce domaine, un lien direct a été observé. En effet, un QRL du riz face à la pyriculariose colocalise très fortement avec une famille de gènes produisant des GLPs (Manosalva *et al.*, 2009). L'extinction de l'expression de ces gènes provoque la disparition de la résistance partielle observée chez le parent résistant.

L'implication des voies de transduction du signal dans la résistance partielle semble être liée à un équilibre entre résistance aux agents nécrotrophes et résistance aux agents biotrophes. Les lignés mutantes dans les voies du SA ou du JA sont souvent plus sensibles à une catégorie d'agents pathogènes et plus résistantes à une autre, surtout lorsque la mutation se trouve dans un gène impliqué dans l'interaction entre elles (par exemple WRKY33 (Zheng *et al.*, 2006), ou bien MPK4 (Petersen *et al.*, 2000)). On peut imaginer que des allèles variés de tels gènes soient impliqués dans des QRLs observés au champ.

Une ancienne idée est que les QRLs seraient des gènes de résistance verticale ayant été contournés dans le passé. En effet, on a pu observer dans certains cas une « résistance résiduelle » de plantes portant un gène de résistance verticale contourné (par exemple chez le riz (Li *et al.*, 1999), ou chez le blé (Brodny *et al.*, 1986 ; Nass *et al.*, 1981)). Plus récemment (Broglie *et al.*, 2006), le clonage positionnel d'un QRL a mis en évidence un gène codant pour une protéine de type NBS-LRR. Plus généralement, on se rend de plus en plus compte que la dichotomie résistance verticale/résistance horizontale n'est pas absolue. Certains gènes de résistance, combinant les caractères partiel et spécifique, par exemple, n'entre pas parfaitement dans les classements traditionnels des mécanismes de la résistance. De même on observe souvent la colocalisation de QRLs et de gènes R, ou bien de RGAs (Resistance Gene Analogs ; par exemple chez le riz (Wisser *et al.*, 2005)).

Comme nous l'avons vu précédemment, les QRLs ne sont pas nécessairement dus à des mécanismes différents de tout ce que l'on connaît déjà. Un certain nombre de travaux montrent un lien fort entre les QRLs et des mécanismes déjà connus pour être impliqués dans les processus de défense et de résistance. Cependant, quelques travaux déjà réalisés indiquent que des mécanismes encore inconnus sont impliqués dans certains cas. Ainsi, deux QRLs du riz face à *M. grisea*, *Pi-21* (Fukuoka *et al.*, 2007) et *Pi-34* (Zenbayashi-Sawata *et al.*, 2007) codent pour des protéines sans rapport avec les mécanismes de résistance connus.

En conclusion, les mécanismes impliqués dans la résistance partielle, comparés à ceux déjà décrits et correspondant aux résistances totales, semblent être fortement diversifiés.

## **4. La résistance de la carotte face à *Alternaria dauci* : mise au point d'une stratégie de recherche**

### **4.1. Déterminisme génétique**

Les données scientifiques concernant les sources, ainsi que les mécanismes de résistance de la carotte à *A. dauci* restent limitées. On sait notamment que les carottes sauvages, ainsi que les variétés commerciales diffèrent dans leur niveau de résistance à *A. dauci*. Dès la fin des années 1980, les sélectionneurs ont fait des progrès importants dans le domaine de la sélection de variétés de carotte partiellement résistantes à *A. dauci*, en particulier avec les variétés Boléro (Vilmorin), Carlo (Tézier) et Nemo (Peltier) (Poissonnier *et al.*, 1995). Cependant, à ce jour, aucune variété de carotte totalement résistante à *A. dauci* n'a été trouvée. Même si les conditions environnementales et le stade physiologique influent sur l'expression de cette résistance, d'où une héritabilité faible à moyenne estimée à 0,40 (Boiteux *et al.*, 1993), il est possible de cartographier ses déterminants génétiques principaux en utilisant une approche QTL (Le Clerc *et al.*, 2009).

Ainsi, une étude sur des lignées maternelles issues du cultivar Brasília (Boiteux *et al.*, 1993) a permis d'étudier l'héritabilité du caractère, tandis que l'étude d'un dispositif diallèle avec cinq parents (12 descendances) a permis de suggérer le caractère polygénique de la résistance, avec quelques gènes dominants (Simon et Strandberg, 1998). Ces deux études portent sur du matériel de type Imperator, très différent de ce qui est cultivé en dehors du territoire américain, notamment en Europe (type Nantaise). Les travaux menés par Pawelec (2005) au cours de sa thèse, puis complétés au sein du laboratoire, ont permis d'établir une première carte de la résistance de la carotte à *A. dauci*. Ce travail mené en collaboration avec les établissements Vilmorin, a porté sur du matériel de type Nantaise et permis d'esquisser pour la première fois l'architecture des déterminants génétiques de la résistance (Le Clerc *et al.*, 2009). Ces travaux, utilisant des méthodes classiques de phénotypage, ont confirmé la

nature polygénique de la résistance à *A. dauci*. Une carte génétique a permis de localiser trois régions chromosomiques à effet significatif sur la résistance (QTLs) expliquant 23 %, 17 % et 10 % de la variation phénotypique totale observée. Ces trois QTL ont été identifiés sur trois groupes de liaison différents. La comparaison de cette première carte génétique avec celle des gènes impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes laissent néanmoins penser que les marqueurs utilisés n'ont pas permis de saturer la carte : des QTL supplémentaires pourraient donc exister (Le Clerc *et al.*, 2009).

## 4.2. Diversité des résistances

D'autres travaux (Boedo *et al.*, 2010) montrent par ailleurs l'existence de plusieurs sources de résistance distinctes, qualitativement différentes et révélées par différentes méthodes de phénotypage. L'existence d'une telle diversité qualitative des résistances partielles est une chance, car elle apporte la possibilité de la construction d'une résistance forte et durable face à l'agent pathogène en assemblant ces différents types de résistance partielle dans un même génotype. Cela suppose de maîtriser les éléments favorables et donc d'acquérir une connaissance approfondie des facteurs impliqués dans cette résistance. Pour cela, préciser les déterminants de l'interaction entre l'hôte et le pathogène est essentiel. Au sein de l'équipe QuaRVeg, et en collaboration avec différents partenaires publics et privés, un travail a été entrepris depuis 2007 afin d'améliorer les connaissances sur l'organisation génétique de la résistance et la caractérisation des composantes de la résistance (projet FUI 'Création Variétale Potagère' 2007-2010). Dans ce cadre, des populations en ségrégation ont été créées dans le but de réaliser une cartographie génétique de la résistance selon différentes composantes de la résistance. Pour ce faire, des plantes ont été évaluées et choisies au sein de plusieurs populations en fonction de leur niveau de résistance globale à *A. dauci*. Afin de produire les populations permettant de construire les cartes, trois génotypes résistants et un génotype sensible ont été croisés. Dans le travail présenté dans le cadre de cette thèse, nous utilisons certains des génotypes sélectionnés.

## 4.3. Quels mécanismes ? Élaboration d'une question de recherche

La question de recherche centrale à laquelle les travaux présentés dans ce manuscrit cherchent à répondre est :

**- À quels mécanismes de défense, les résistances observées correspondent-elles ?**

Les mécanismes sous-jacents au déterminisme de la résistance partielle commencent à émerger pour certaines interactions plante/agent pathogène. Ils semblent marqués du sceau de la diversité. Des mécanismes nouveaux semblent parfois impliqués (par exemple, Fukuoka *et al.*, 2007), mais on retombe souvent sur des aspects déjà connus des mécanismes de résistance (par exemple, Stewart *et al.*, 2003). Dans cette veine, on peut noter que des coségrégations ont déjà été observées entre des QTLs de résistance partielle et des clusters d'homologues de gènes de défense (pour exemple, chez le riz, Wang *et al.*, 2001). Ce type de résultat peut laisser penser que le déterminisme de certaines résistances partielles est lié à un polymorphisme des gènes impliqués dans les mécanismes de défense. En particulier, un cluster de gènes de défense de la famille GLP (Germin-Like Proteins) co-localise avec un QTL majeur de résistance à la pyriculariose, chez le riz (Manosalva *et al.*, 2009).

Comme nous l'avons vu précédemment, les voies de transduction du signal peuvent différer en fonction de la biologie de l'agent pathogène. De façon très simplifiée, la voie du SA correspond plutôt aux agents pathogènes biotrophes, la voie du JA est plus souvent activée lors d'attaques par des agents nécrotrophes, tels que *A. dauci* (Glazebrook, 2005). Sur la base de ces données, il nous semble possible de faire l'hypothèse que le polymorphisme quantitatif du niveau de résistance de la carotte à *A. dauci* est, au moins en partie, dû à un polymorphisme des gènes de défense et de transduction du signal liés à la voie de l'acide jasmonique. Afin de préciser notre première question de recherche, nous nous sommes donc attachés à répondre à cette seconde question :

**- Ces mécanismes sont-ils liés à la voie de l'acide jasmonique ?**

Une deuxième piste suivie est celle de la « guerre chimique », au cours de laquelle plante et agent pathogène échangent des composés toxiques issus du métabolisme secondaire. Ce phénomène est particulièrement présent dans l'interaction carotte/*A. dauci*. Chez ce dernier, au moins deux types de toxines sont mis en jeu, dont une toxine non spécifique, le zinniol (Barash *et al.*, 1981) et un ou plusieurs composés toxiques mis en évidence par Cora Boedo au cours de sa thèse (Boedo, 2009). *Alternaria dauci* produit aussi des métabolites secondaires potentiellement phytotoxiques qui lui sont propres (Andersen *et al.*, 2008). L'hypothèse selon laquelle des mécanismes de résistance aux toxines sont présents chez la carotte mérite ainsi d'être testée.

On peut aussi se demander de façon symétrique si les molécules de défense produites par la carotte ont un rôle dans sa résistance face à *A. dauci*. En effet, la carotte produit au moins une phytoalexine (la 6-méthoxymelléine (Mercier et Kuć, 1997)) et deux phytoanticipines appartenant à la famille des polyacétylènes (le falcarinol et le falcarindiol (Harding et Heale, 1980)). Ainsi, l'existence d'un échange probable de molécules du métabolisme secondaire entre la carotte et *A. dauci* nous amène à poser une troisième question de recherche :

**- Ces mécanismes sont-ils liés à la guerre chimique ?**

## 4.4. Comment tester nos hypothèses ? Élaboration d'une stratégie de recherche

Afin de répondre aux trois questions de recherche, nous avons mis en place une stratégie dont le déroulement correspond aux chapitres II, III et IV du manuscrit.

Le chapitre II traite du rôle des molécules de défense de la carotte dans la spécificité d'hôte, et dans la résistance face à *A. dauci*. Dans un premier temps, le taux de molécule de défense a été mesuré chez différentes variétés de carotte, en présence ou en absence d'*A. dauci*. Parallèlement, la résistance de plusieurs souches d'*A. dauci* aux molécules de défense de la carotte a été testée, ainsi que la résistance de souches appartenant à deux autres espèces du même genre (*A. radicina* et *A. brassicicola*).

Le chapitre III traite symétriquement de la résistance de la carotte face aux toxines fongiques. Dans notre pathosystème, il existe des difficultés pour clairement identifier les individus résistants et surtout pour quantifier le niveau de résistance de ces individus. En effet, la carotte est une plante allogame avec laquelle on ne peut obtenir de lignées fixées, d'où les difficultés observées d'analyse génétique liées à l'hétérozygotie. Nous avons donc mis en place un système basé sur la culture *in vitro* de cellules de carotte entretenues en suspension en milieu liquide. Ces cellules ont été confrontées à différentes fractions d'exsudats fongiques, ainsi qu'au zinniol. Plusieurs variétés de carotte ont ainsi été testées, afin de rechercher une corrélation entre la résistance des plantes confrontées à l'agent pathogène et la résistance de cellules isolées face aux toxines produites par celui-ci.

Le chapitre IV est centré sur le lien entre résistance et voie de l'acide jasmonique. En l'absence de données génomiques préexistantes, un certain nombre de gènes impliqués dans ou contrôlés par la voie des jasmonates ont été clonés en utilisant une démarche basée sur des oligonucléotides dégénérés. Le polymorphisme de séquence de ces gènes a été étudié, ainsi que leur polymorphisme de niveau d'expression, chez différents génotypes de carotte, afin, là aussi, de rechercher une corrélation entre ce polymorphisme et la résistance.

## **Chapitre II :**

### **Implication des molécules de défense**

## 1. Introduction

Une plante exprimant une résistance partielle vis-à-vis d'un agent pathogène est en fait une plante capable de réagir à l'agression. Cette réaction, appelée défense, permet à la plante de diminuer l'impact de l'agent pathogène et se matérialise de différentes façons, comme la formation de formes actives de l'oxygène (ROS), l'expression de gènes de défense (ex. protéines PR) ou la production de métabolites de défense. La plupart des plantes possèdent la capacité de produire ces métabolites secondaires qui auraient un rôle de protection contre les attaques pathogènes ; ces molécules de défense préexistent dans la plante (phytoanticipines) ou leur synthèse est induite en réponse à l'attaque par un agent pathogène (phytoalexines). Une revue concernant les phytoalexines a été récemment publiée (Ahuja *et al.*, 2012). Parmi les phytoalexines, citons la camalexine et la brassinine chez les Brassicacées, la pisatine chez les Fabacées, le capsidiol chez les Solanacées, etc.

Chez la carotte, des composés synthétisés sous l'effet de stress biotiques et abiotiques et appartenant à plusieurs familles chimiques sont décrits dans la littérature. Parmi ceux-ci, une phytoalexine, la 6-méthoxymelléine (6-MM), est connue chez la carotte pour s'accumuler dans la racine suite à une irradiation aux UV, à une exposition à l'éthylène ou à une infection par *Botrytis cinerea* (Fan *et al.*, 2000 ; Mercier *et al.*, 1993). Une autre classe de composés, les polyacétylènes, dont les plus connus sont le falcarinol et le falcarindiol, ont été identifiés dans les racines de carotte. Ces polyacétylènes auraient plutôt une action de type phytoanticipine. Leur concentration peut varier en conditions de stress hydrique (Lund et White, 1990 ; Olsson et Svensson, 1996). Des effets antifongiques du falcarindiol ont été montrés chez *Mycocentrospora acerina*, agent de pourritures racinaires de la carotte (Garrod *et al.*, 1979). La majorité des travaux de caractérisation de ces métabolites de défense concernent la racine de carotte, cependant la production de 6-MM et de polyacétylènes dans les feuilles de cette espèce a été également décrite (Mercier et Kuć, 1997 ; Städler et Buser, 1984).

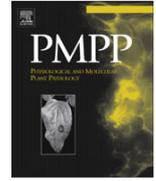
Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes posé la question suivante : Quel est le rôle de la 6-MM et des polyacétylènes dans la résistance partielle de la carotte face à *A. dauci* ? Dans ce chapitre, nous avons étudié l'activité antifongique potentielle de ces

composés par une mesure de leurs effets *in vitro* sur le développement du champignon par des méthodes de microscopie classique et de néphélométrie. En utilisant des techniques de type HPLC ou UHPLC-ESI-MS, nous avons effectué des mesures de concentration *in planta* de la 6-MM, du falcarinol et du falcarindiol suite à l'inoculation par *A. dauci* de deux variétés commerciales de carotte, l'une partiellement résistante (Boléro), l'autre sensible à *A. dauci* (Presto) ; ceci afin de vérifier la corrélation entre les teneurs mesurées dans la plante et le niveau de résistance de ces deux génotypes. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article publié dans *Physiological and Molecular Plant Pathology* en 2012. Ce travail a été mené en collaboration avec d'autres laboratoires de recherche.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Physiological and Molecular Plant Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pmpp](http://www.elsevier.com/locate/pmpp)

## Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and falcarindiol on development of the fungal leaf blight pathogen *Alternaria dauci*

Mickaël Lecomte<sup>a,b,c,1</sup>, Romain Berruyer<sup>a,c,1</sup>, Latifa Hamama<sup>a,b,c</sup>, Cora Boedo<sup>a,c</sup>, Piétrick Hudhomme<sup>d</sup>, Stéphanie Bersihand<sup>a,c</sup>, Joseph Arul<sup>e</sup>, Guillaume N'Guyen<sup>a,c</sup>, Julia Gatto<sup>f</sup>, David Guilet<sup>f</sup>, Pascal Richomme<sup>f</sup>, Philippe Simoneau<sup>a,c</sup>, Mathilde Briard<sup>b,c</sup>, Valérie Le Clerc<sup>b,c</sup>, Pascal Poupard<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Université d'Angers, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, SFR 4207 QUASAV, PRES L'UNAM, F-49045 Angers, France

<sup>b</sup> Agrocampus Ouest, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49045 Angers, France

<sup>c</sup> INRA, UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences, F-49071 Beaucouzé, France

<sup>d</sup> Université d'Angers, MOLTECH Anjou, UMR CNRS 6200, F-49045 Angers, France

<sup>e</sup> Université Laval, Département des Sciences des Aliments et de la Nutrition, Québec G1V 0A6, Canada

<sup>f</sup> SONAS, SFR 4207 QUASAV, F-49100 Angers, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 3 October 2012

## Keywords:

Antifungal metabolites  
*Daucus carota* subsp. *sativus* L.  
 Nephelometry  
 Partial resistance  
 Phytoalexin  
 Phytoanticipin  
 Polyacetylenes

## ABSTRACT

The *in vitro* effects of 6-MM and falcarindiol on the development of *Alternaria dauci* were analyzed. The results showed that *A. dauci* was significantly more susceptible to falcarindiol than to 6-MM. Experiments dealing with mixed solutions of 6-MM and falcarindiol indicated additive effects of the metabolites on growth inhibition. Permeabilization of the fungal plasma membrane was observed after falcarindiol treatment. *In planta* quantification of 6-MM/falcarindiol was performed on inoculated leaves of carrot genotypes. Significantly faster 6-MM production was observed in Bolero (partially resistant to *A. dauci*) than in Presto (susceptible). The falcarindiol levels were significantly higher in Bolero than in Presto.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Alternaria dauci* is a necrotrophic fungal pathogen responsible for *Alternaria* leaf blight (ALB) in cultivated carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*). Significant ALB damage has been reported in carrot production areas [1]. Different control measures are used to limit the disease impact, including prophylactic methods, fungicide applications and genetic control. Partially resistant genotypes against *A. dauci* have already been marketed for many years, but breeders are still searching for higher levels of resistance to ALB in order to improve this control method. Among the molecular mechanisms that could be involved in the resistance to ALB, the role of carrot defense metabolites has, to our knowledge, never been deeply explored.

Plant resistance to pathogens can be at least partly due to high production of different types of defense metabolites, including phytoanticipins and phytoalexins. In carrot, stress-related substances belong to several metabolite families, including isocoumarins, phenylpropanoids and polyacetylenes [2], and some of these metabolites have been described in relation to fungal pathogen attacks. The role of the major phytoalexin 6-methoxymellein (6-MM), an isocoumarin, has been widely studied and its accumulation in carrot roots was observed in different abiotic or biotic stresses, such as plant treatment by ultraviolet radiation, ethylene or *Botrytis cinerea* infection [3,4]. The role of 6-MM in carrot resistance to *B. cinerea* was hypothesized, as the concentration accumulating in roots was considered sufficient to limit fungal growth [4].

Apart from its presence in roots, 6-MM was also detected in aerial parts of carrots inoculated with *Cercospora carotae*, another fungal pathogen responsible for leaf blight [5]. However, as relatively late induction of 6-MM production was observed after plant inoculation, i.e. when the first disease symptoms appeared, the authors concluded that 6-MM has no major role in carrot resistance to *C. carotae*. Investigations were conducted to estimate 6-MM levels in carrot after artificial contamination by *Alternaria* species:

Abbreviations: ALB, *Alternaria* leaf blight; CG, conidial germination; GT, germ tube length; MGR, maximum growth rate; 6-MM, 6-methoxymellein.

\* Corresponding author. Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers cedex 01, France. Tel.: +33 2 41 73 54 58; fax: +33 2 41 73 53 52.

E-mail address: [pascal.poupard@univ-angers.fr](mailto:pascal.poupard@univ-angers.fr) (P. Poupard).

<sup>1</sup> Contributed equally to the present work.

De Girolamo et al. [6] did not find any significant increase in 6-MM in several carrot cultivars in response to infection by *Alternaria alternata* or *Alternaria radicina*. In the study of Fan et al. [3], the carrot pathogen *A. radicina* was shown to induce 6-MM accumulation more efficiently than *Alternaria brassicicola*, a pathogen of Brassicaceae species. A moderate correlation ( $r^2 = 0.61$ ) between 6-MM production in carrot cell cultures and the resistance of different carrot genotypes to *A. dauci* was found [7], but further work is needed to specify the phytoalexin activity against this major fungal pathogen of carrot leaves.

Among stress-related substances described in carrot, polyacetylenes have been largely mentioned in the literature. These metabolites are present in plant species belonging to several botanical families, including Apiaceae, Araliaceae and Asteraceae [8]. The characteristics of faltarinol and faltarindiol, two major polyacetylenes identified in carrot, have been reported in numerous papers. Faltarinol-type polyacetylenes tend to be constitutively present, indicating that they could act primarily as preinfective compounds or phytoanticipins. The polyacetylene concentration in carrot is apparently dependent on environmental conditions, as a decrease in roots was significantly observed after water-stress [2].

The *in vitro* effects of polyacetylenes have been studied to determine the concentrations that could inhibit the development of fungal pathogens: the antifungal activities of faltarindiol and faltarinol were respectively described with respect to *Mycocentrospora acerina* [9,10] and *B. cinerea* [11], two pathogens that cause root rot in stored carrots prior to their marketing. Cellular effects caused by faltarindiol on *M. acerina* were investigated, and structural or functional damage was observed [10]. Faltarinol and faltarindiol derived from root extracts of several carrot genotypes were quantified to evaluate the potential role of polyacetylenes in the resistance to *M. acerina*, *Sclerotinia sclerotiorum* or *Rhizoctonia carotae* [12]. The most significant effect was observed with faltarindiol against *M. acerina*, which seems to be in accordance with previous findings at the cellular level [10].

Polyacetylenes are not exclusively produced in roots, but are also constituent of aerial parts in Apiaceae species. Faltarindiol and

faltarinol were quantified in roots, leaves and fruits of the wild Apiaceae species *Cryptotaenia canadensis* [8]. In this species, both faltarindiol and faltarinol were significantly detected in leaves, but faltarindiol was the major polyacetylene when considering the overall level in the whole plant. Faltarinol was shown to be present in leaves and stems of *Aegopodium podagraria*, another wild Apiaceae species [13]. Recently, faltarindiol was extracted from leaves of sea fennel, *Crithmum maritimum*, in order to study its antimicrobial activity [14]: this polyacetylene strongly inhibited the growth of two bacteria, *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus*. To our knowledge, the production and potential role of polyacetylenes in relation to carrot infection by aerial fungal pathogens have never been described to date.

In this paper, we present data obtained when exploring the putative antifungal role of two plant secondary metabolites, 6-MM and faltarindiol, in the *D. carota*–*A. dauci* interaction. We measured the *in vitro* effects of the plant metabolites against *A. dauci* strains with different aggressiveness levels. In these experiments, a recently-published nephelometric procedure [15] was compared with standard microscopical methods to study fungal development. The use of a fluorogenic dye enabled us to investigate the effect of 6-MM and faltarindiol on membrane permeabilization in *A. dauci*. Meanwhile, using HPLC and UHPLC–Electrospray ionization (ESI)–MS respectively, the 6-MM and faltarindiol concentrations were measured in carrot leaves inoculated by *A. dauci* in two genotypes differing in their extent of resistance to ALB.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungal strains, culture conditions and preparation of conidial suspensions

The fungal strains used in this study and their characteristics are listed in Table 1. *A. dauci* strains were grown in Petri dishes on V8 juice agar medium (20% V8 vegetable juice, 3 g l<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, 15 g l<sup>-1</sup> agar, pH 6.8), incubated in darkness at 22 ± 2 °C for 7 days, and then exposed to 12 h near-u.v. light (Philips, TL-D 36 W) per day at 22 ± 2 °C for 10–15 days. *A. dauci* strains were identified on the

**Table 1**

Source of *Alternaria* spp. strains used in this study and characteristics of *Alternaria dauci* strains based on intergenic spacer (IGS) sequence polymorphism and aggressiveness.

Strain accession <sup>a</sup>	Other collection code <sup>a</sup>	Host of origin	Geographic origin	Year of isolation	IGS pattern <sup>b</sup>	Aggressiveness <sup>c</sup>
<i>Alternaria dauci</i>						
AUS001	10631	<i>Daucus carota</i> (leaf)	Australia	NA <sup>d</sup>	C3	2
BRA002	Vil1(93.19)3	<i>D. carota</i> (leaf)	Brazil	2006	C1	n.a.
FRA001	A2	<i>D. carota</i> (leaf)	France (Maine et Loire)	2000	C1	2
FRA012	C5	<i>D. carota</i> (leaf)	France (Gers)	2000	C2	4
FRA016	P1S	<i>D. carota</i> (leaf)	France (Gironde)	2000	C1	3/4
FRA017	P2	<i>D. carota</i> (leaf)	France (Gironde)	2000	C1	2/3
FRA018	P3	<i>D. carota</i> (leaf)	France (Gironde)	2000	n.a.	1
<i>Alternaria brassicicola</i>						
Abra43	n.a.	<i>Raphanus sativus</i>	France (Lot et Garonne)	1999	n.a.	n.a.
Abra18b	n.a.	<i>R. sativus</i>	France (Eure et Loir)	1999	n.a.	n.a.
Abra3	n.a.	<i>R. sativus</i>	France (Aude)	1999	n.a.	n.a.
AbraCM	n.a.	<i>Brassica oleracea</i>	France	2005	n.a.	n.a.
<i>Alternaria radicina</i>						
Arad58	CBS 109.58 ATCC 14569	<i>D. carota</i>	NA	1958	n.a.	n.a.
Arad67	CBS 245.67 ATCC 6503	<i>D. carota</i>	USA (Washington)	1967	n.a.	n.a.

<sup>a</sup> Abbreviations for strain code: CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures; ATCC, American Type Culture Collection.

<sup>b</sup> IGS patterns correspond to clusters described in Boedo et al. [16]; n.a.: not applicable.

<sup>c</sup> Aggressiveness as defined in Boedo et al. [16] using a lesion number criterion. The scale used in the table is from weakly aggressive strain (1) to highly aggressive strain (4); n.a.: not applicable.

<sup>d</sup> NA: not available.

basis of morphological and molecular criteria as previously described [16]. *A. brassicicola* strains have been previously described [17] and were grown in Petri dishes on malt agar medium (20 g l<sup>-1</sup> malt extract, 20 g l<sup>-1</sup> agar), incubated in darkness at 22 ± 2 °C for 10–15 days. *A. radicina* strains purchased from Centraalbureau voor Schimmelcultures, were grown in Petri dishes on malt agar medium and incubated in the same conditions as *A. dauci* strains. Conidial suspensions were prepared according to Boedo et al. [16] and adjusted to 1 × 10<sup>4</sup> conidia ml<sup>-1</sup> for *A. dauci* and to 1 × 10<sup>5</sup> conidia ml<sup>-1</sup> for *A. brassicicola* and *A. radicina*.

## 2.2. Antimicrobial metabolites

The phytoalexin 6-methoxymellein (6-MM) was extracted from carrot roots according to Kurosaki and Nishi [18] and Seljåsen et al. [19] with some modifications. Carrots (2 kg fresh wt roots) were minced in a blender upon freezing (–78 °C) and the carrot puree was extracted with acetone (3 × 2 l) after stirring for 30 min at room temperature. Following filtration, the combined organic layers were partially concentrated at 40 °C under vacuum (Büchi Rotavapor R-114). The resulting aqueous phase was extracted with chloroform (4 × 500 ml). The organic solution was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residual carrot material was purified by silica gel chromatography using dichloromethane as eluting solvent. Recrystallization (dichloromethane/petroleum ether) generated 235 mg of 6-MM as colorless fine needles. Spectroscopic characterizations [<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR), heteronuclear multiple quantum correlation (HMQC) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) experiments, MS] were in agreement with previously reported data on 6-MM [20]. The 6-MM purity (>99%) used in this study was determined by elemental analysis: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> (208.21); calculated %: C 63.45; H 5.81; found %: C 63.31; H 5.87.

The polyacetylenes, faltarinol and faltarindiol, were extracted from freeze-dried whole parsnips according to the procedure described by Zidorn et al. [21] with some modifications. The dried tissue powder (160 g) was dispersed in 2 l dichloromethane and kept in the dark under constant stirring for 20 h at room temperature. The mixture was filtered under vacuum through Whatman number 1 filter paper. The residue was then re-extracted using 1 l dichloromethane for 5 h, and the filtrates were pooled and concentrated by evaporation to near dryness under vacuum at 37 °C on a Büchi Rotavapor. The concentrate was recovered in 5 ml of dichloromethane, and finally evaporated to dryness under nitrogen. About 2 g of the extract was purified by column chromatography (SiliaFlash G60, 60–200 µm, Silicycle). Separation was performed using a hexane/ethyl acetate mixture as eluting solvent. Fractions containing pure compounds were pooled after verification on TLC using authentic standard compounds provided by Dr. E.D. Lund (USDA, Winter Haven, FL). The identity and purity of faltarinol and faltarindiol were determined by GC–MS. Fractions were analyzed on an HP6890 GC coupled to a 5973N quadrupole MS detector (Agilent Technologies). The compounds were separated using a Zebtron ZB-5ms capillary column (Phenomenex). Mass spectra were generated in electron impact mode in the 32–350 amu scan range at 70 eV. Compounds were identified using pure standards and by comparison with spectra cataloged in the National Institute of Standards Library (2005) and spectral data of Metzger and Barnes [22]. The structures of 6-MM, faltarinol and faltarindiol are shown in Fig. 1.

For some experiments, the phytoalexin camalexin was used as reference. Camalexin was synthesized according to Ayer et al. [23]. Stock solutions were prepared at the desired concentration using methanol, ethanol and dimethylsulfoxide (DMSO) as solvents for 6-MM, polyacetylenes and camalexin, respectively. In both controls and assays on biological material, methanol and DMSO concentrations did not exceed 4% (v/v), while ethanol did not exceed 2%.

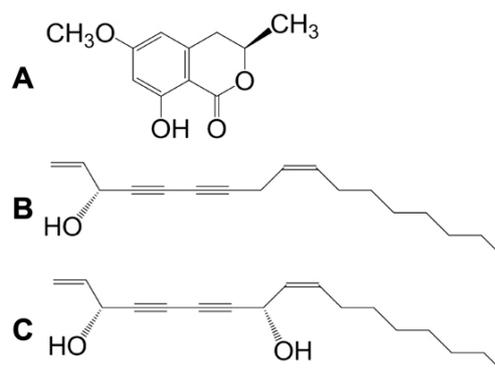


Fig. 1. Chemical structures of 6-methoxymellein (A), faltarinol (B) and faltarindiol (C).

## 2.3. Measurement of in vitro conidial germination and germ tube elongation after 6-MM treatment

The effects of 6-MM on conidia germination and germ tube elongation of *Alternaria* isolates were tested as follows. Conidial suspensions (100 µl) were mixed with 6-MM to obtain a desired concentration (between 0 and 3544 µM) and sterile water was added to the final volume of 1.2 ml. The suspensions were then transferred to glass slides (five slides per concentration) in Petri dishes sealed with Parafilm 'M' (American National Can) to avoid evaporation. Incubation took place at 24 °C in darkness for 4 (*A. dauci*) or 5 h (*A. brassicicola*). The percentage of conidia germination (CG, 100 spores per treatment) and germ tube length (GT, 50 germinated conidia per treatment) were determined under a light microscope (Leica DM4500B, Leica Microsystems, Axiovision Software). A spore was scored as germinated if the germ tube length was equal in size to that of the conidium. Dose–response curves allowed determination of concentrations causing a 50% reduction in conidia germination or germ tube elongation (IC50).

## 2.4. Measurement of fungal growth by nephelometry

The protocol described by Joubert et al. [15] was used to study hyphal growth in liquid media by nephelometry. Conidial suspensions (1 × 10<sup>4</sup> spores ml<sup>-1</sup> for *A. dauci*, 1 × 10<sup>5</sup> spores ml<sup>-1</sup> for *A. brassicicola* and *A. radicina*, final concentration) were inoculated onto microplate wells containing the test substances (6-MM, faltarinol or both) in malt 2% in a total volume of 300 µl. The final concentrations used for 6-MM were between 0 and 720 µM, those used for faltarindiol were between 1 and 200 µM. Microplates were placed in a laser-based microplate nephelometer (NEPHELOstar, BMG Labtech) and growth was monitored automatically over a 30 h period at 25 °C. At least three replicates per treatment were performed. Data were exported from Nephelostar Galaxy software in ASCII format and further processed in Microsoft Excel. Data were expressed as relative nephelometric units. The area under the growth curve (AUC) and the maximum growth rate (MGR) were calculated as previously reported [15,24]. The dose–response curves allowed determination of concentrations causing a 50% reduction in fungal growth (IC50).

## 2.5. SYTOX green uptake assays

For membrane permeabilization assays, antimicrobial compounds (400 µM or 700 µM 6-MM; 100 µM faltarindiol) were added to 17 h-old germinating conidia of the *A. dauci* FRA017 strain grown in liquid medium containing 2% malt. Incubation in the

presence of the fungus was then carried out for 4 and 24 h. Negative controls were performed by adding the relevant solvent (methanol or ethanol as solvents for 6-MM or falcarindiol, respectively, 0.2–1% v/v final concentration) instead of the tested compound. The positive control was performed using the *A. brassicicola* Abra43 strain exposed to 125 µM camalexin in the conditions described by Sellam et al. [25]. After treatment, 1 ml of incubation mixtures were mixed with an SYTOX green solution (Invitrogen, 1 µM final concentration) and immediately observed under a Leica DM4500B fluorescence microscope (using 480 nm excitation and 527 nm emission). The SYTOX green can only penetrate cells that have compromised plasma membranes, and it fluoresces upon binding to DNA.

#### 2.6. HPLC determination of 6-MM levels in carrot leaves

Carrots of cv. Presto and cv. Bolero (Vilmorin, France), respectively susceptible and partially resistant to *A. dauci*, were grown in boxes as previously described [26]. A Petri dish inoculation chamber was set up around the third true leaf (f3) without detaching it from the plant, as described in Boedo et al. [26]. Spray inoculation was performed as already described [16] on 6 week old plants with the inoculum concentration set at  $1 \times 10^3$  conidia ml<sup>-1</sup> using the *A. dauci* strain FRA017. For each cultivar, five f3 leaves in a box (26 boxes per carrot genotype) were inoculated manually by spraying 400 µl of the conidial suspension per leaf. Before inoculation, Tween 20 was added to the conidial suspension at a final concentration of 0.05%. Control plants were sprayed with 0.05% Tween 20 solution in sterile distilled water (400 µl per leaf). The greenhouse temperature was set at  $24 \pm 2$  °C. For 6-MM quantification, samples consisted of three f3 laminas collected per day from 0 to 13 days post-inoculation on inoculated plants or at 13 days on uninoculated plants. For each sampling date and each cultivar/strain combination, the experiment was repeated three times. Leaf samples were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until extraction of 6-MM.

The 6-MM was extracted from leaf samples according to Seljåsen et al. [19] with the following modifications. Frozen tissues (0.75–1.2 g per sample) were extracted with 10 ml of boiling bidistilled water. The extract was boiled for 10 min and filtered through a Black Ribbon Ashless filter (number 300,009, Schleicher & Schuell GmbH). Solid phase extraction was performed by pressing the filtrate through a C<sub>18</sub> silica gel column (Sep-Pack® cartridge, part number 51910, Waters) previously conditioned with methanol (4 ml) then water (10 ml). A glass syringe was used to inject 1.9 ml of methanol through the column for 6-MM elution. The eluate was filtered through a 0.45 µm filter, then evaporated under vacuum at low pressure and low temperature. The dry product was dissolved in 500 µl methanol and injected in HPLC. The 6-MM extracted from carrot root as described above, was used as external standard, using concentrations ranging from 0.1 to 100 µg ml<sup>-1</sup>. Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, Sigma) was used as internal standard. Nineteen microliters of a juglone solution (500 µg ml<sup>-1</sup>) were added to each sample before storage at –20 °C.

6-MM detection and quantification were performed using a Shimadzu HPLC chain equipped with a solvent deliverer module (LC-10AT vp), an autosampler (SIL-10AD vp), an u.v./visible photodiode array detector (SPD-M10 Avp) and a system controller (Scl-10 Avp). A guard column and a silica gel column C<sub>18</sub> (Uptisphere C18-ODB 250 × 4.6 mm, Interchim) were used. The analysis was performed with class vp software. 6-MM was detected at 267 nm according to Howard et al. [27]. The chromatographic conditions were as previously described by Seljåsen et al. [19] with some modifications: samples were analyzed using flow 1 ml min<sup>-1</sup> with

the following gradient: 40% methanol in water for 2 min, 40–60% in 10 min, 60–80% in 12 min, 80–60% in 5 min, 60–40% in 3 min, and 40% for 3 min. To validate the protocol, some experiments were performed using purified 6-MM, which was added in the biological sample before or after 6-MM extraction.

#### 2.7. UHPLC–ESI–MS determination of falcarinol and falcarindiol levels in carrot leaves

Standard inoculation of plants (cv. Presto and cv. Bolero) was performed as previously described [26]. Samples consisted of the second (f2) and third (f3) true leaves from five inoculated plants (with *A. dauci* strain FRA017) collected at 0, 4, 10, 15, 21 and 25 days post-inoculation or from five control plants collected at 0 and 25 days after water spraying. Lyophilized powdered carrot leaves (80–750 mg) were extracted by Pressurized Liquid Extraction (PLE) with a SpeedExtractor E-914 (Büchi). The plant material was extracted in 40 ml PLE cells with dichloromethane. Crude extracts were concentrated at 30 °C under reduced pressure and protected from light. Dried extracts were extemporaneously dissolved in ethyl acetate/ethanol (50:50, v/v) at the working concentration of 10 mg ml<sup>-1</sup> and filtered through a 0.2 µm nylon membrane prior to immediate analysis by UHPLC–ESI–MS.

Ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) was performed using an Accela High Speed LC System (ThermoFisher Scientific) comprising a quaternary pump with an on-line degasser, an autosampler, a photodiode array (PDA) detector and a TSQ Quantum Access MAX triple stage quadrupole mass spectrometer with an ESI interface. The chromatographic separation of polyacetylenes was achieved on a Phenomenex C<sub>18</sub> reversed-phase analytical column (2.1 × 100 mm × 1.7 µm, Kinetex C18 100A). A gradient elution of water (Milli-Q quality)/0.1% formic acid and acetonitrile (LC–MS grade)/0.1% formic acid was used. Two microliters of each extract were injected using the partial loop injection mode (10 µl loop size). The autosampler tray temperature was set at 4 °C. The PDA detector was set in the wavelength range 200–350 nm with three selected channels at 205, 254 and 280 nm. Data were acquired and processed by Xcalibur 2.0 software (ThermoFisher Scientific).

Single Reaction Monitoring transitions used for polyacetylenes and internal standard MS quantifications were as follows: for falcarinol, precursor ion (*m/z*): 268 [M + H–H<sub>2</sub>O + MeCN]<sup>+</sup>, product ion (*m/z*) (Collision Energy): 182 [M + H–H<sub>2</sub>O + MeCN]<sup>+</sup> – C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (25 V); for falcarindiol, precursor ion (*m/z*): 284 [M + H–H<sub>2</sub>O + MeCN]<sup>+</sup>, product ion (*m/z*) (Collision Energy): 157 [M + H–H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> – C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (25 V); for [6]-gingerol (internal standard), precursor ion (*m/z*): 277 [M + H–H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, product ion (*m/z*) (Collision Energy): 177 [M + H–H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> – C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O (12 V). Two calibration curves were established using serial dilutions of falcarinol and falcarindiol in ethyl acetate/ethanol (50:50, v/v). Standard solutions were freshly prepared to obtain six concentrations in the range of 0.125–8 µg ml<sup>-1</sup> for falcarinol and 1.25–80 µg ml<sup>-1</sup> for falcarindiol. Ten microliters of a [6]-gingerol stock solution (1 mg ml<sup>-1</sup>) stored at –80 °C were systematically added in an LC vial to 790 µl of extract (prepared as described above) or calibration sample. The polyacetylene concentration was determined from the following equation:

$$C_p = [((A_p/A_{IS}) - b)/k] \times C_{IS(\text{ext})} \quad \text{with } k = a \times C_{IS(\text{cal})}$$

$C_p$ : polyacetylene concentration in µg ml<sup>-1</sup>

$A_p$ : peak area of the polyacetylene (falcarindiol or falcarinol)

$A_{IS}$ : peak area of the internal standard

$C_{IS(\text{ext})}$ : internal standard concentration in µg ml<sup>-1</sup> of the extract

$C_{IS (cal)}$ : internal standard concentration in  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of the calibration curve

$k$ : polyacetylene response coefficient

$b$ : y intercept of the calibration curve

$a$ : slope of the calibration curve

### 2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were done with the R software package version 2.12.0 [28]. CG, GT, AUC and MGR showed homoscedasticity in all experiments performed here (Breusch–Pagan test,  $\alpha = 1\%$ ). When only one chemical species was tested, linear regression was used to calculate IC50 for CG, GT, AUC and MGR. Fungal strain effects were compared either by analysis of variance (ANOVA) and multiple comparisons using a Waller–Duncan  $k$ -ratio test [29] with  $k$  set at 100, or on the basis of the 95% confidence interval of IC50. When several chemical species were used, additive effects and interaction significances were evaluated by ANOVA. Effects of cultivar and time on carrot leaf 6-MM levels were studied using ANOVA and linear models. 6-MM, falcarinol and falcarindiol concentrations in  $\mu\text{M}$  ([6-MM], [Falcarinol] and [Falcarindiol] respectively) did not show homoscedasticity, whereas  $\log([6\text{-MM}])$ ,  $\log([Falcarinol])$  and  $\log([Falcarindiol])$  did. Statistical analyses were therefore performed from  $\log([6\text{-MM}])$ ,  $\log([Falcarinol])$  and  $\log([Falcarindiol])$ . Residuals were found to be normally distributed (normal Q–Q plot) in all ANOVA and linear models presented here.

## 3. Results

### 3.1. In vitro susceptibility of *Alternaria* spp. strains to 6-MM assessed by microscopical methods and nephelometry

Five *A. dauci* strains differing in their geographical origins (AUS001, BRA002, FRA001, FRA017, FRA018) and two *A. brassicicola* strains (Abra43 and Abra18b, see Table 1) were used to study the effects of the phytoalexin 6-MM on conidial germination (CG) and on germ tube (GT) elongation. The IC50 obtained for the two measured criteria were roughly within the 1–2.5 mM range (Fig. 2). A continuous variation in CG IC50 values was globally observed for *A. dauci* isolates. However, some values significantly differed from others, e.g. FRA001 and FRA018 strains were significantly less susceptible than AUS001. Because of the smaller confidence intervals, the GT IC50 values allowed distinction of four 6-MM sensitivity levels among *A. dauci* strains. For the two criteria, both *A. brassicicola* strains were classified among the most susceptible strains of the test.

In a next step, the effect of 6-MM on fungal growth was studied using nephelometry. Five *A. dauci* strains differing in their aggressiveness or intergenic spacer (IGS) patterns were used (AUS001, FRA001, FRA016, FRA017, FRA018, see Table 1). Four *A. brassicicola* strains and two *A. radicina* strains (Table 1) were also included in the study as reference species, i.e. non-pathogenic or pathogenic on carrot. The IC50 values were calculated from the area under the growth curve (AUC) and the maximum growth rate (MGR) (Fig. 3). The four *A. brassicicola* strains were the most susceptible in the test, with IC50 values ranging from 100 to 300  $\mu\text{M}$  of 6-MM for both growth parameters. By comparison, *A. dauci* and *A. radicina* strains exhibited AUC and MGR IC50 values ranging from 300 to 550  $\mu\text{M}$  (except for the *A. dauci* FRA018 strain). A continuous variation in AUC and MGR IC50 values was generally observed when considering all studied strains. There was no evident correlation between the aggressiveness of *A. dauci* strains and their susceptibility to the phytoalexin.

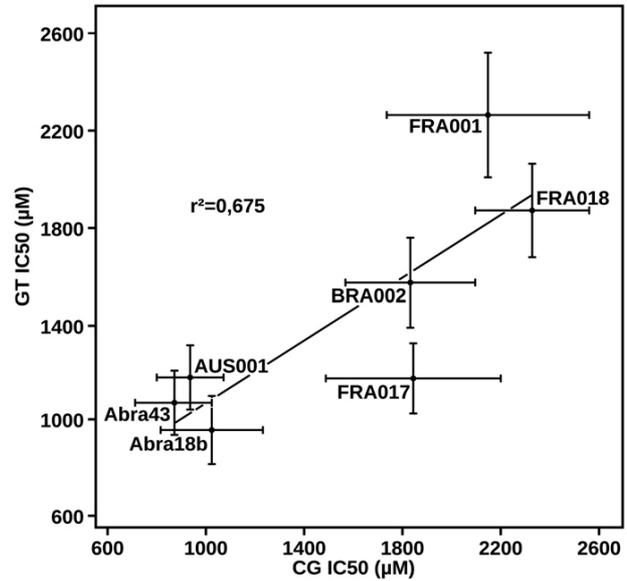


Fig. 2. Concentrations of 6-methoxymellein causing 50% reduction in conidial germination (CG IC50 on x-axis) and in germ tube elongation (GT IC50 on y-axis) calculated from microscopical measurements in different *Alternaria dauci* and *Alternaria brassicicola* strains. CG IC50 and GT IC50 were determined using 100 and 50 spores, respectively, per treatment. Bars correspond to the 95% confidence interval of IC50. Linear regression lines and correlation coefficients are indicated.

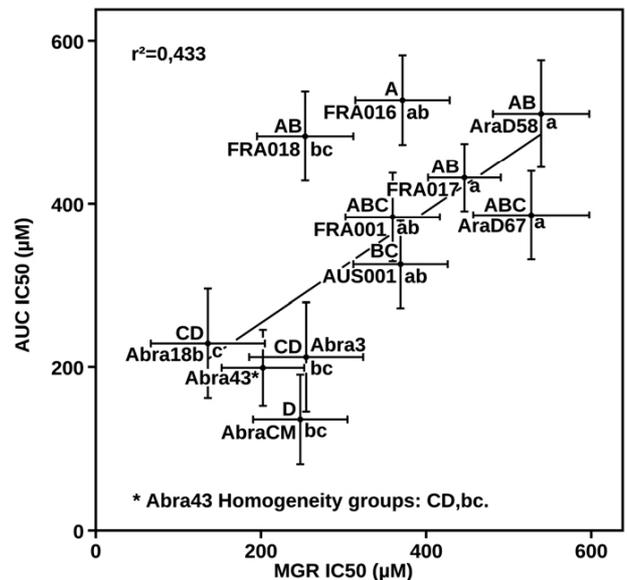


Fig. 3. Concentrations of 6-methoxymellein causing 50% reduction (IC50) in fungal growth calculated from nephelometric measurements in different *Alternaria dauci*, *Alternaria brassicicola* and *Alternaria radicina* strains. IC50 values were calculated from the maximum growth rate (MGR IC50 on x-axis) and the area under the growth curve (AUC IC50 on y-axis). Data are means and standard errors of IC50 calculated from at least three replicates. Homogeneity groups are indicated by capital letters for AUC IC50 values and by lower case letters for MGR IC50 values. Figures labeled with the same letter are not significantly different. Linear regression lines and correlation coefficients are indicated.

The correlation coefficients between growth parameters used in Fig. 2 (microscopical measurements) and in Fig. 3 (nephelometric measurements) were calculated and indicated that the CG and GT IC50 values were well correlated, but not as strongly as could be expected ( $r^2 = 0.675$ ). A moderate correlation ( $r^2 = 0.433$ ) was obtained between MGR and AUC IC50 values. AUC and microscopical parameters were moderately to strongly correlated ( $r^2 = 0.378$  and  $0.788$ , when considering GT and CG, respectively). By comparison, low correlation coefficients were obtained between MGR and microscopical parameters ( $r^2 = 0.08$  and  $0.156$ , for GT and CG, respectively). The above results allowed us to validate the AUC parameter in the nephelometric procedure as a valuable criterion for studying 6-MM effects on fungal growth by comparison with microscopical measurements.

### 3.2. In planta quantification of 6-MM in two *A. dauci*-inoculated carrot genotypes

For HPLC quantification of 6-MM, the phytoalexin was extracted from carrot leaves inoculated with the reference *A. dauci* strain FRA017. The 6-MM levels in two carrot genotypes, one susceptible (Presto) and one partially resistant (Bolero) to *A. dauci*, were compared at different times after inoculation, between 0 and 13 days post-inoculation. In a first step, days post-inoculation and the cultivar combination were treated as a factor. In uninoculated samples,  $\log([6\text{-MM}])$  was not significantly different amongst cultivars. In inoculated samples,  $\log([6\text{-MM}])$  was higher in Bolero than in Presto, and seemed to show a linear correlation with days post-inoculation in both cultivars (see Table 1 in Supplementary data). Accordingly, a days post-inoculation + cultivar + interaction linear model was fit for  $\log([6\text{-MM}])$ , with days post-inoculation considered as a quantitative variable. Effects of days post-inoculation and the interaction were found to be significant ( $p = 2.87 \cdot 10^{-11}$  and  $p = 0.0033$ , respectively), while the additive cultivar effect was not ( $p = 15\%$ ). Therefore, a days post-inoculation + interaction model was fit, as shown in Fig. 4, together with the  $CI_{95\%}$  envelopes and means obtained. This model also suggests that Bolero and Presto genotypes do not have significantly different levels of 6-MM prior to inoculation, but that 6-MM accumulation in the partially resistant cultivar is faster, leading to an up to 6-fold difference at 13 days post-inoculation.

### 3.3. In vitro susceptibility of *A. dauci* and *A. brassicicola* strains to faltarinol and faltarindiol and in planta quantification of polyacetylenes

Preliminary experiments were performed to compare the effects of two polyacetylenes, faltarinol and faltarindiol, on the growth of *A. dauci* (strain FRA017) and *A. brassicicola* (strain Abra43) using nephelometry. Only the AUC IC50 values were considered for these analyses, as the AUC was better correlated with CG and GT growth parameters by comparison with MGR in experiments dealing with 6-MM. The AUC IC50 values corresponding to faltarinol obtained with FRA017 and Abra43 were equivalent (272 and 284  $\mu\text{M}$ , respectively). By comparison with faltarinol, both strains were more susceptible to faltarindiol, with AUC IC50 reaching 102  $\mu\text{M}$  and 37  $\mu\text{M}$  for FRA017 and Abra43, respectively. Further experiments were conducted with faltarindiol alone since it was about 2.5-fold more active than faltarinol in reducing the growth of reference strain FRA017.

Six *A. dauci* strains differing in their IGS patterns or aggressiveness (Table 1) and two *A. brassicicola* strains were used. Three *A. dauci* strains (FRA001, FRA012, FRA018) and the *A. brassicicola* strains had AUC IC50 values that differed significantly from the value of reference strain FRA017, which was 2- to 3-fold less susceptible to faltarindiol (Fig. 5). Intermediate AUC IC50 values

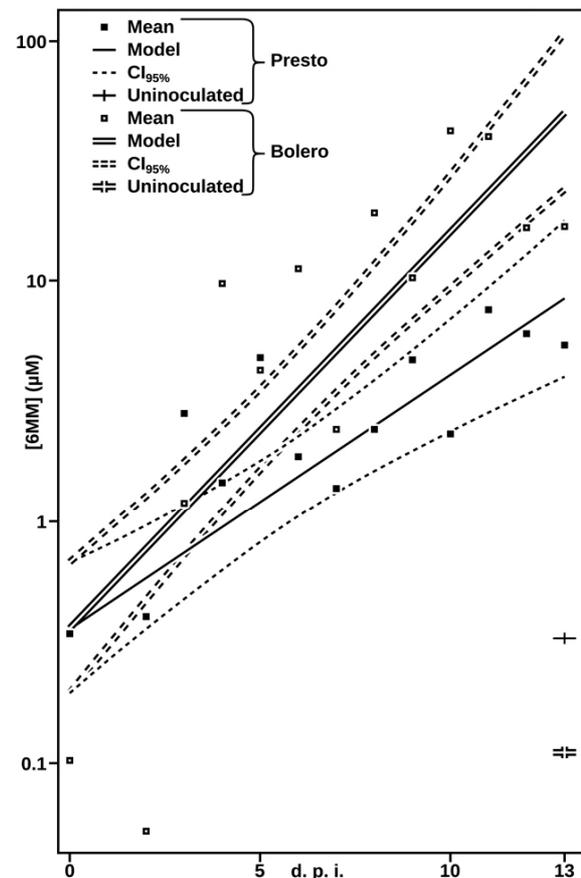


Fig. 4. In planta quantification of 6-methoxymellein (6-MM), expressed as  $\log([6\text{-MM}])$ , in leaves of two carrot genotypes (Presto and Bolero, respectively susceptible and partially resistant) collected 0–13 days post-inoculation (d.p.i) with *Alternaria dauci* reference strain FRA017. A days post-inoculation + interaction model with 95% confidence interval ( $CI_{95\%}$ ) envelopes is presented together with observed means.

were obtained for *A. dauci* strains AUS001 and FRA016. No correlation was found between the resistance to faltarindiol and the strain aggressiveness. For all strains, the results showed a higher inhibitory activity of faltarindiol by comparison with 6-MM: AUC IC50 values relevant to 6-MM (Fig. 3) were 5- to 15-fold higher than AUC IC50 values corresponding to faltarindiol (Fig. 5). Classifications of *Alternaria* strains on the basis of their susceptibility to 6-MM or faltarindiol differed. The correlation coefficient between AUC IC50 values determined after 6-MM or faltarindiol treatment was relatively poor ( $r^2 = 0.203$ ).

The levels of faltarinol and faltarindiol in leaves of cv. Presto (susceptible to *A. dauci*) and cv. Bolero (partially resistant), were compared at different times after inoculation (between 0 and 25 days post-inoculation) with *A. dauci* strain FRA017. The faltarinol concentrations were comprised between 10 and 35  $\mu\text{M}$  in Presto, while the levels were in the same range in Bolero (8–58  $\mu\text{M}$ , no significant difference with cv. Presto). No correlation between the variations of faltarinol concentrations and the inoculation of leaves with *A. dauci* was evident. By comparison with faltarinol, the concentrations of faltarindiol were higher in both carrot genotypes, in the 100–450  $\mu\text{M}$  (Presto) and 230–560  $\mu\text{M}$  (Bolero) ranges. Faltarindiol concentrations were significantly higher in Bolero than in Presto. They also were significantly higher in infected leaves than in uninfected ones (see Table 2 in Supplementary data).

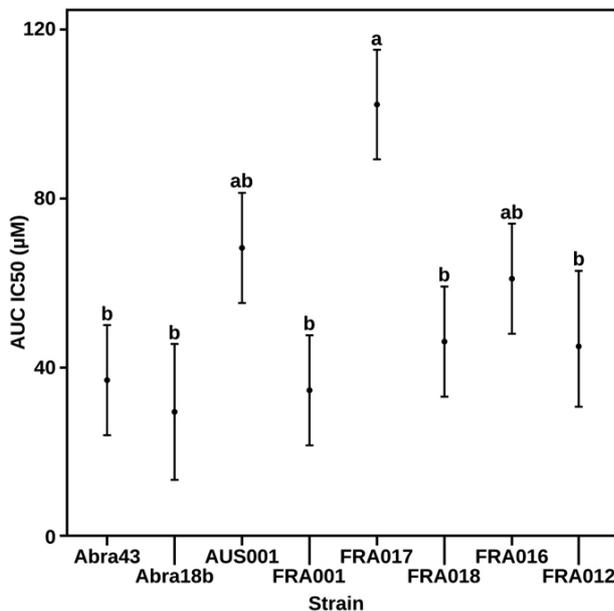


Fig. 5. Falcarindiol concentrations causing 50% reduction (IC<sub>50</sub>) in fungal growth calculated from nephelometric measurements in different *Alternaria dauci* and *Alternaria brassicicola* strains. IC<sub>50</sub> values were calculated from the area under the growth curve (AUC). Data are means and standard errors of IC<sub>50</sub> calculated from at least three replicates. Numbers followed by the same letter are not significantly different.

#### 3.4. Membrane permeabilization assays using 6-MM or falcarindiol and assessment of a potential interaction effect between the two metabolites

An assay based on penetration of the fluorogenic dye SYTOX green was used to visualize the effect of 6-MM or falcarindiol on membrane integrity in *A. dauci* reference strain FRA017. Sellam et al. [25] previously showed that the phytoalexin camalexin induces fungal membrane permeabilization in *A. brassicicola*. A positive control was thus performed using germinated conidia of *A. brassicicola* strain Abra43 treated with 125 µM camalexin (a dose corresponding to the IC<sub>50</sub>) for 4 and 24 h. Green fluorescence was clearly observed in *A. brassicicola* hyphae in these conditions (Fig. 6A). The fluorescence signal was also observed in *A. dauci* after treatment of germinated conidia for 4 or 24 h with 100 µM falcarindiol (i.e. around the IC<sub>50</sub>), while no fluorescence was detected in the control (Fig. 6B). The fluorescence intensity obtained with *A. dauci* hyphae treated with falcarindiol was equivalent to that observed in the Abra43/camalexin positive control, at least for 4 h treatment with the antimicrobial molecule. No or very little green fluorescence was detected in *A. dauci* hyphae treated with 400 µM 6-MM (nearly the IC<sub>50</sub>) or relevant control samples after 4 or 24 h (Fig. 6C). The same results were obtained using 700 µM 6-MM (results not shown).

In a next step, the combined effect of 6-MM and falcarindiol on *A. dauci* growth was studied by nephelometry to determine if there was any interaction between the two metabolites and to determine the nature of this interaction (synergy or antagonism), if any. Fungal growth (AUC) of the FRA017 strain was measured with different 6-MM and falcarindiol concentrations, with the two compounds being either combined or alone. Linear models built from this dataset (Table 2) showed that, as expected, fungal growth was linearly inhibited by these two metabolites. Moreover, no significant interaction effects were found. These results suggest that (i) the

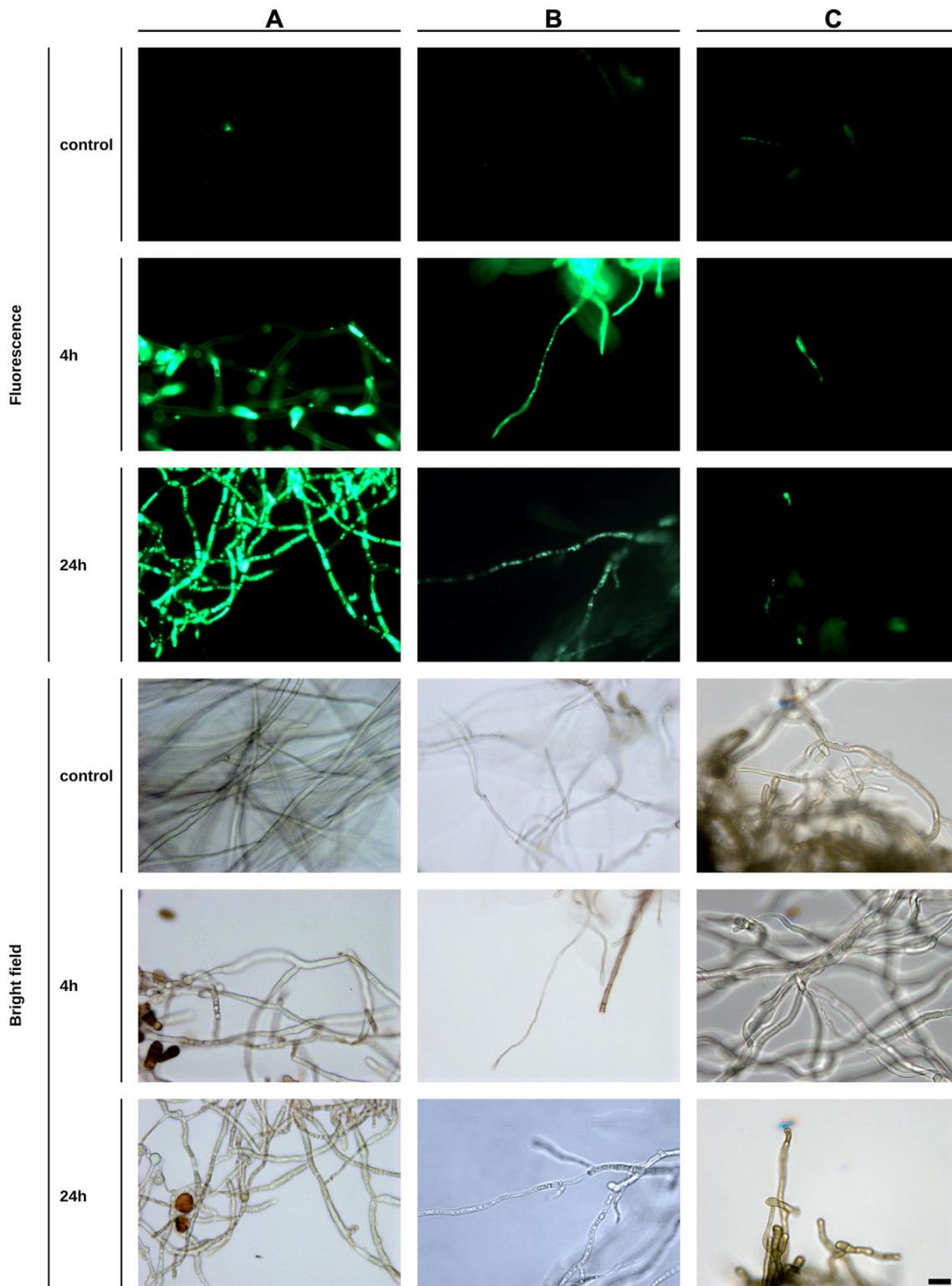
inhibition effects of falcarindiol and 6-MM are additive, and (ii) these two compounds have no or few agonistic or antagonistic effects.

#### 4. Discussion

This paper presents results obtained when assessing the involvement of carrot secondary metabolites, a phytoalexin (6-MM) and a phytoanticipin (falcarindiol), in the interplay of plant partial resistance and *A. dauci* aggressiveness. The main results showed that (1) falcarindiol was more active than 6-MM in reducing the *in vitro* development of *A. dauci*, (2) the inhibition effects of 6-MM and falcarindiol were additive, (3) falcarindiol, but not 6-MM, was able to induce permeabilization of *A. dauci* plasma membrane, (4) significantly faster production of 6-MM was observed in the partially resistant carrot genotype (Bolero) by comparison with the susceptible one (Presto) after *A. dauci* inoculation, (5) the falcarindiol levels were significantly higher in Bolero than in Presto and increased in the two genotypes in response to *A. dauci* inoculation.

The *in vitro* effects of 6-MM and falcarindiol were studied by microscopical and/or nephelometric approaches in order to determine the inhibition levels of these potential antifungal metabolites on *A. dauci* development. To our knowledge, this is the first report of antifungal activities of a polyacetylene against a leaf carrot pathogen, as previous studies were more focused on the effects of falcarinol or falcarindiol on the development of root fungal pathogens such as *B. cinerea* or *M. acerina* [9–11]. In our assays, *A. brassicicola* strains were generally more susceptible to 6-MM by comparison with *A. dauci* or *A. radicina* strains (Figs. 2 and 3), suggesting higher activity of this secondary metabolite against a non-carrot fungal pathogen. These results are in agreement with the concept of an adaptation/co-evolution of carrot fungal pathogens to/with their host plant. Fan et al. [3] found higher induction of 6-MM synthesis in carrot inoculated with *A. radicina* than after inoculation with *A. brassicicola*. Variations in *in vitro* IC<sub>50</sub> results among *Alternaria* species should be compared to *in planta* concentrations of antifungal metabolites in order to evaluate the metabolite activity against pathogen development in the plant.

In the present study, we compared levels of 6-MM production in *A. dauci*-inoculated leaves in two carrot genotypes differing in their degrees of resistance to the fungal pathogen. Although the 6-MM amounts were similar in both uninoculated genotypes, the significantly faster production of 6-MM in cv. Bolero after inoculation with *A. dauci* suggests that the phytoalexin could participate in resistance reactions limiting fungal development in this genotype. In a previous paper [26], after drop inoculation with *A. dauci* (isolate FRA017), the extent of disease was visually assessed in cv. Bolero and cv. Presto using a symptom number per conidia ratio. The inoculation conditions were similar to those used here. In that study, the most relevant results indicated a significantly lower disease index in cv. Bolero by comparison with cv. Presto at 13 days post-inoculation (on 6 week old plants after inoculation with 200 conidia ml<sup>-1</sup>). These conditions could correspond to higher phytoalexin accumulation in the partially resistant genotype, in agreement with the results presented in Fig. 4. The IC<sub>50</sub> nephelometric value of 6-MM corresponding to strain FRA017 was around 450 µM, i.e. about twentyfold more than the concentration of 6-MM determined *in planta* (whole leaf) of cv. Bolero at 13 days post-inoculation. This *in planta* concentration is compatible with an inhibitory action of 6-MM against *A. dauci*, as the phytoalexin produced in the plant should be concentrated at or near infection sites. Boedo et al. [26] also monitored the onset of leaf blight symptoms caused by *A. dauci* reference strain FRA017 in cv. Bolero and cv. Presto after conidial spray inoculation. At 15 days post-inoculation, the development of *A. dauci*, visually assessed or



**Fig. 6.** Determination of membrane damage in *Alternaria brassicicola* strain Abra43 treated with 125  $\mu\text{M}$  camalexin (A) or in *A. dauci* strain FRA017 treated with 100  $\mu\text{M}$  faltarindiol (B) or 400  $\mu\text{M}$  6-methoxymellein (C). Membrane integrity was checked using a fluorogenic dye assay in 17-h germinated conidia treated for 4 and 24 h with the antimicrobial molecule. Controls were incubated for 24 h with dimethylsulfoxide (0.1%, v/v, panel A), 24 h with ethanol (0.2%, v/v, panel B) or 24 h with methanol (1% v/v, panel C). For each panel, the upper part corresponds to fluorescence microscopy and the lower part to bright-field microscopy. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

**Table 2**

Inhibitory effects of faltarindiol and 6-methoxymellein (6-MM), combined, on *Alternaria dauci* growth. Growth of the FRA017 strain was measured by nephelometry (area under the growth curve) in culture media containing various amounts of 6-MM (0–960  $\mu\text{M}$ ) and faltarindiol (0–200  $\mu\text{M}$ ), i.e. 0 to  $2 \times \text{IC}_{50}$  for both compounds, alone or combined. The statistics shown here correspond to two different linear models, one with (a) and the other without (b) an interaction variable. When taken into account, the interaction variable did not show a significant effect.

Intercept, model	Coefficient <sup>a</sup>	SE <sup>b</sup>	t Stat	P <sup>c</sup>
a – Two factors with interaction				
Intercept	377.41	14.243	26.50	$<2 \cdot 10^{-16}$
Faltarindiol ( $\mu\text{M}$ )	-1.9345	0.1490	-12.98	$<2 \cdot 10^{-16}$
6-MM ( $\mu\text{M}$ )	-0.4480	0.0368	-12.17	$<2 \cdot 10^{-16}$
Interaction	0.0006	0.0021	0.31	0.758
b – Two factors without interaction				
Intercept	376.99	14.056	26.82	$<2 \cdot 10^{-16}$
Faltarindiol ( $\mu\text{M}$ )	-1.9119	0.1289	-14.84	$<2 \cdot 10^{-16}$
6-MM ( $\mu\text{M}$ )	-0.4441	0.0343	-12.96	$<2 \cdot 10^{-16}$

<sup>a</sup> Coefficient of the factor effect on the variable. All factors presented here are quantitative.

<sup>b</sup> Standard error of the coefficient.

<sup>c</sup> Probability of overcoming the t value associated with the factor by chance.

quantified by quantitative PCR, was significantly lower in the partially resistant genotype by comparison with the susceptible one. As already described above, 6-MM could have a possible role in slowing down pathogen spread in the partially resistant genotype, but with a relatively limited effect, as equivalent disease indexes and fungal biomass were assessed on the two genotypes at 25 days post-inoculation. Transient inhibition of *A. dauci* development observed in Bolero by comparison with the susceptible genotype at 15 days post-inoculation suggests that *A. dauci* could tolerate the higher levels of 6-MM in the partially resistant genotype.

In this paper, relatively strong inhibition of *A. dauci* development was observed in the presence of the polyacetylene faltarindiol, with  $\text{IC}_{50}$  nephelometric values ranging from 34 to 102  $\mu\text{M}$  (Fig. 5). By comparison, in *M. acerina*, the faltarindiol concentration causing 50% inhibition of chlamyospore germination was 122  $\mu\text{M}$  [9,10]. This value is nearly equivalent to the  $\text{IC}_{50}$  obtained with the least susceptible *A. dauci* strain in our study, while keeping in mind that the  $\text{IC}_{50}$  values were determined by different methods in both studies. To our knowledge, except the present work, no information is available concerning the amount of faltarindiol in carrot leaves. In the study of Eckenbach et al. [8], the faltarindiol concentrations measured in leaves of the wild Apiaceae species *C. canadensis* was around 150  $\mu\text{g g}^{-1}$  fresh wt (equivalent to around 560  $\mu\text{M}$ ), a concentration estimated as being 5- to 15-fold higher than  $\text{IC}_{50}$  nephelometric values determined for *A. dauci* in the present work. Here, similar faltarindiol levels (around 560  $\mu\text{M}$ ) were measured using infected carrot leaves of cv. Bolero collected at 25 days post-inoculation. As faltarindiol levels are different in leaves, roots and fruits of *C. canadensis* [8], the amounts of this polyacetylene may also vary in different carrot organs. The accumulation of faltarindiol in leaves of cv. Bolero (this study) is indeed stronger than in roots (whole organ) of the same cultivar, where faltarindiol amounts of 70–150  $\mu\text{M}$  were measured [30]. The previous studies described above highly suggest that *in planta* faltarindiol concentrations should be sufficient to inhibit *A. dauci* development in carrot leaves, especially in the partially resistant cv. Bolero.

Few papers have previously considered the quantification of several secondary carrot metabolites *in planta* during a same experiment. Coaccumulation of stress-related compounds, including 6-MM, faltarinol and para-hydroxy-benzoic acid, was

observed in carrot root slices inoculated by *B. cinerea*, with no evidence of a synergistic effect between these metabolites [31]. Here, no interaction in terms of fungal growth inhibition was noted between faltarindiol and 6-MM in nephelometric experiments dealing with both molecules, and additive effects were observed. Otherwise, *in planta* concentrations of 6-MM, faltarinol and faltarindiol were determined in roots of five carrot genotypes in response to u.v.-treatment, and no correlation was obtained between phytoalexin production and polyacetylene levels among cultivars [32]. Recently, accumulation of 6-MM was measured in carrot roots infected by *M. acerina*, while levels of polyacetylenes (including faltarinol and faltarindiol) did not change in the same plant material [33]. In the present paper, the SYTOX assay results showed that faltarindiol, by contrast to 6-MM, was able to induce plasma membrane permeabilization. These observations at the cellular level and the additive effects of both molecules described above indicate that 6-MM and faltarindiol likely have different modes and/or sites of action. In our nephelometric experiments (Figs. 3 and 5), the classification of the *Alternaria* strains differed on the basis of their susceptibility to 6-MM or faltarindiol, also suggesting an independent mode of action of the two antifungal compounds. At the cellular level, faltarindiol-induced alteration effects have been previously described in *M. acerina* [10], including hyphal apex bursting or plasmalemma alteration.

In conclusion, the polyacetylene faltarindiol exhibited antifungal *in vitro* activity against *A. dauci*, which was stronger than the phytoalexin 6-MM. *In planta* metabolite quantification results suggest a relatively minor role of 6-MM in the resistance to *A. dauci*, at least in the partially resistant genotype studied here, thus supporting the findings of Bruemmer and White [7]. Higher accumulation of faltarindiol in cv. Bolero than in cv. Presto suggests that this polyacetylene may contribute to plant resistance against the leaf blight pathogen. The potential role of faltarindiol in the resistance to *A. dauci* should be further studied. Recently, a spectroscopic study allowing to visualize the distribution of polyacetylenes across sections of wild carrot root has been published [34]. In future investigations, it would be of high interest to determine the localization of faltarindiol in carrot leaf sections after inoculation with *A. dauci* in order to observe the possibility of local increase of this polyacetylene near infection sites. Undesirable effects should be also considered as it was demonstrated that: (i) faltarindiol, by contrast to 6-MM, significantly contributes to the bitter taste of carrot [20], (ii) faltarindiol could stimulate oviposition of the carrot fly [35].

## Acknowledgments

The authors would like to thank Anita Suel, Linda Voisine, Sébastien Huet (Agrocampus Ouest) and Bruno Hamon (Université d'Angers) for their technical assistance, Rémi Gardet and Jacky Granger (Agrocampus Ouest) for their help in the greenhouse experiments, David Manley for reviewing the English. Aymeric Joubert, Benoit Calmes and Thomas Guillemette are also gratefully acknowledged for advice in nephelometric experiments and SYTOX assay. This work was partly financed by the French General Board for Companies ('Création Variétale Potagère' FUI project, 2007–2010). Cora Boedo was granted a doctoral fellowship by ANRT (CIFRE)/Clause Vegetable Seeds.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2012.10.002>.

## References

- [1] Ben-Noon E, Shtienberg D, Shlevin E, Vintal H, Dinoor A. Optimization of chemical suppression of *Alternaria dauci*, the causal agent of *Alternaria* leaf blight in carrots. *Plant Dis* 2001;85:1149–56.
- [2] Lund ED, White JM. Polyacetylenes in normal and water-stressed 'Orlando Gold' carrots (*Daucus carota*). *J Sci Food Agr* 1990;51:507–16.
- [3] Fan X, Mattheis JP, Roberts RG. Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. *Physiol Plantarum* 2000;110:450–4.
- [4] Mercier J, Roussel D, Charles MT, Arul J. Systemic and local responses associated with UV and pathogen induced resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrot. *Phytopathology* 2000;90:981–6.
- [5] Mercier J, Kuc J. Elicitation of 6-methoxymellein in carrot leaves by *Cercospora carotae*. *J Sci Food Agr* 1997;73:60–2.
- [6] De Girolamo A, Solfrizzo M, Vitti C, Visconti A. Occurrence of 6-methoxymellein in fresh and processed carrots and relevant effect of storage and processing. *J Agr Food Chem* 2004;52:6478–84.
- [7] Bruemmer JH, White JM. Use of phytoalexin production in carrot cell cultures to evaluate leaf blight susceptibility. *Proc Fla State Hort Soc* 1986;99:156–7.
- [8] Eckenbach U, Lampman RL, Seigler DS, Ebinger J, Novak RJ. Mosquitocidal activity of acetylenic compounds from *Cryptotaenia canadensis*. *J Chem Ecol* 1999;25:1885–93.
- [9] Garrod B, Lewis BG, Coxon DT. Cis-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. *Physiol Plant Pathol* 1978;13:241–6.
- [10] Garrod B, Lea EJA, Lewis BG. Studies on the mechanism of action of the antifungal compound falcariindiol. *New Phytol* 1979;83:463–71.
- [11] Harding VK, Heale JB. Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiol Plant Pathol* 1980;17:277–89.
- [12] Olsson K, Svensson R. The influence of polyacetylenes on the susceptibility of carrots to storage diseases. *J Phytopathol* 1996;144:441–7.
- [13] Orav A, Viitak A, Vaher M. Identification of bioactive compounds in the leaves and stems of *Aegopodium podagraria* by various analytical techniques. *Procedia Chem* 2010;2:152–60.
- [14] Meot-Duros L, Cérantola S, Talarmin H, Le Meur C, Le Floch G, Magné C. New antibacterial and cytotoxic activities of falcariindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food Chem Toxicol* 2010;48:553–7.
- [15] Joubert A, Calmes B, Berruyer R, Pihet M, Bouchara JP, Simoneau P, et al. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *Biotechniques* 2010;48:399–404.
- [16] Boedo C, Benichou S, Berruyer R, Bersihand S, Dongo A, Simoneau P, et al. Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* in a controlled environment. *Plant Pathol* 2012;61:63–75.
- [17] Iacomi-Vasilescu B, Avenot H, Bataillé-Simoneau N, Laurent E, Guénaud M, Simoneau P. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both carboximides and phenylpyrroles. *Crop Prot* 2004;23:481–8.
- [18] Kurosaki F, Nishi A. Isolation and antimicrobial activity of the phytoalexin 6-methoxymellein from cultured carrot cells. *Phytochemistry* 1983;22:669–72.
- [19] Seljåsen R, Bengtsson GB, Skrede G, Vogt G. Rapid analysis of 6-methoxymellein in carrots by boiling water extraction, solid phase extraction and HPLC. *Food Chem* 2000;70:397–401.
- [20] Czepa A, Hofmann T. Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree. *J Agr Food Chem* 2003;51:3865–73.
- [21] Zidorn C, Jöhner K, Ganzera M, Schubert B, Sigmund EM, Mader J, et al. Polyacetylenes from the Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *J Agr Food Chem* 2005;53:2518–23.
- [22] Metzger BT, Barnes DM. Polyacetylene diversity and bioactivity in orange market and locally grown colored carrots (*Daucus carota* L.). *J Agr Food Chem* 2009;57:11134–9.
- [23] Ayer WA, Craw PA, Ma YT, Miao SC. Synthesis of camalexin and related phytoalexins. *Tetrahedron* 1992;48:2919–24.
- [24] Meletiadiis J, te Dorsthorst DTA, Verweij PE. Use of turbidimetric growth curves for early determination of antifungal drug resistance of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003;41:4718–25.
- [25] Sellam A, Dongo A, Guillemette T, Hudhomme P, Simoneau P. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Mol Plant Pathol* 2007;8:195–208.
- [26] Boedo C, Berruyer R, Lecomte M, Bersihand S, Briard M, Le Clerc V, et al. Evaluation of different methods for the characterization of carrot resistance to the *Alternaria* leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*) revealed two qualitatively different resistances. *Plant Pathol* 2010;59:368–75.
- [27] Howard LR, Griffin LE, Lee Y. Steam treatment of minimally processed carrot sticks to control surface discoloration. *J Food Sci* 1994;59:356–8.
- [28] R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing [cited 2012 Jun 11]. Available from: <http://www.r-project.org>; 2010.
- [29] de Mendiburu F. *Agricolae*: statistical procedures for agricultural research. R package version 1.1-1 [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing [cited 2012 Jun 11]. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>; 2012.
- [30] Kidmose U, Hansen SL, Christensen LP, Edelenbos M, Larsen E, Norbaek R. Effects of genotype, root size, storage, and processing on bioactive compounds in organically grown carrots (*Daucus carota* L.). *J Food Sci* 2004;69:S388–94.
- [31] Harding VK, Heale JB. The accumulation of inhibitory compounds in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiol Plant Pathol* 1981;18:7–15.
- [32] Mercier J, Ponnampalam R, Bérard LS, Arul J. Polyacetylene content and UV-induced 6-methoxymellein accumulation in carrot cultivars. *J Sci Food Agr* 1993;63:313–7.
- [33] Louarn S, Nawrocki A, Edelenbos M, Jensen DF, Jensen ON, Collinge DB, et al. The influence of the fungal pathogen *Mycocentrospora acerina* on the proteome and polyacetylenes and 6-methoxymellein in organic and conventionally cultivated carrots (*Daucus carota*), during post harvest storage. *J Proteomics* 2012;75:962–77.
- [34] Roman M, Dobrowolski JC, Baranska M, Baranski R. Spectroscopic studies on bioactive polyacetylenes and other plant components in wild carrot root. *J Nat Prod* 2011;74:1757–63.
- [35] Städler E, Buser HR. Defense chemicals in leaf surface wax synergistically stimulate oviposition by a phytophagous insect. *Experientia* 1984;40:1157–9.

## 2.5. Supplementary data

**Table 1 (supplementary data):** Levels of 6-methoxymellein (6-MM) measured in carrot leaves of cv. Presto (susceptible to *Alternaria dauci*) and cv. Bolero (partially resistant) between 0 to 13 days after inoculation with *A. dauci* (strain FRA017). Data and homogeneity groups presented here are results of a linear model where days post-inoculation and the cultivar combination were treated as a factor. Log transformed and untransformed data are shown.

		Presto			Bolero		
		Log ([6-MM])	[6-MM] ( $\mu$ M)	Group	Log ([6-MM])	[6-MM] ( $\mu$ M)	Group
Control	(non inoculated)	-0,613	0,243	hi	-1,091	0,081	ij
Inoculated	0 dpi	-0,595	0,254	hi	-1,118	0,076	ij
	2 dpi	-0,521	0,301	ghi	-1,414	0,039	j
	3 dpi	0,320	2,093	cdef	-0,051	0,888	fgh
	4 dpi	0,029	1,071	efgh	0,859	7,239	abcd
	5 dpi	0,553	3,574	bcdef	0,499	3,155	bcdef
	6 dpi	0,134	1,362	defgh	0,920	8,335	abc
	7 dpi	0,011	1,027	efgh	0,252	1,789	cdef
	8 dpi	0,257	1,810	cdef	1,153	14,243	ab
	9 dpi	0,542	3,485	bcdef	0,885	7,679	abcd
	10 dpi	0,236	1,722	cdefg	1,496	31,397	a
	11 dpi	0,751	5,644	bcde	1,471	29,624	a
	12 dpi	0,652	4,488	cdef	1,088	12,260	ab
	13 dpi	0,606	4,039	cdef	1,094	12,417	ab

**Table 2 (supplementary data):** Levels of faltarindiol measured in carrot leaves of cv. Presto (susceptible to *Alternaria dauci*) and cv. Bolero (partially resistant) between 0 and 25 days after inoculation with *A. dauci* (strain FRA017). Data and homogeneity groups presented here are results of a linear model where days post-inoculation and the cultivar combination were treated as a factor. Log transformed and untransformed data are shown.

		Presto			Bolero		
		Log ([Faltarindiol])	[Faltarindiol] ( $\mu$ M)	Group	Log ([Faltarindiol])	[Faltarindiol] ( $\mu$ M)	Group
non inoculated	0 dpi	2,208	161,297	f	2,369	234,030	d
	25 dpi	2,035	108,322	g	2,379	239,213	d
Inoculated	0 dpi	2,302	200,440	e	2,404	253,787	d
	4 dpi	2,378	238,959	d	2,674	472,070	b
	10 dpi	2,628	424,427	b	2,538	344,845	c
	15 dpi	2,650	446,719	b	2,560	363,407	c
	21 dpi	2,523	333,232	c	2,627	423,865	b
	25 dpi	2,233	171,187	f	2,743	553,678	a

### 3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'implication de métabolites de défense dans la résistance partielle de la carotte à *A. dauci*. À partir de la mesure du taux de germination des conidies, de la longueur des tubes germinatifs et de la croissance fongique par néphélométrie, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur du faltarindiol et de la 6-MM sur le développement du champignon. De façon générale, le faltarindiol a un effet plus marqué que la 6-MM sur le développement d'*A. dauci*. Il y a un effet additif des deux molécules, ce qui laisse supposer des mécanismes d'action différents sur le champignon. Par ailleurs, *Alternaria brassicicola*, champignon non pathogène sur carotte est plus sensible à la 6-MM qu'*A. dauci* et *A. radicina*, autre espèce pathogène de la carotte. Ce résultat permet de faire l'hypothèse que la 6-MM pourrait surtout contribuer aux mécanismes de résistance non-hôte (Lecomte *et al.*, 2012a ; cf. Annexe 9).

Par ailleurs, en réponse à l'inoculation par *A. dauci*, la production de 6-MM est plus rapide et elle s'accumule de façon plus importante chez le génotype résistant Boléro, comparativement au génotype sensible Presto. La 6-MM pourrait participer à la résistance partielle en limitant le développement du champignon. Cependant les résultats de dosage de la 6-MM *in planta*, et de quantification de la biomasse fongique dans les feuilles (Boedo *et al.*, 2010) suggèrent un rôle mineur de la phytoalexine dans la résistance partielle, au moins dans le cas de Boléro. Les teneurs en faltarindiol sont constitutivement plus importantes dans les feuilles du génotype Boléro que dans celles de Presto ; ces teneurs augmentent dans les deux variétés après inoculation par *A. dauci*. Chez Boléro, les concentrations mesurées sont compatibles avec un effet antifongique *in planta*. Les travaux présentés ici ont été mentionnés dans un éditorial du journal dans lequel notre article a été publié, ce qui montre que ce travail a été remarqué par la communauté scientifique (Hammerschmidt, 2012 ; cf. Annexe 8).

Les métabolites secondaires étudiés ne permettent pas d'expliquer complètement la résistance partielle observée chez Boléro, leur rôle est très certainement secondaire. On peut donc se demander quels sont les autres mécanismes composant cette résistance partielle ? Nous avons vu dans la synthèse bibliographique, que le couple plante/agent pathogène se livre une véritable guerre chimique lors de leur interaction. Nous savons qu'un champignon

nécrotrophe, tel qu'*A. dauci*, est capable de produire des métabolites toxiques qui auront un effet direct sur les cellules végétales. Nous pouvons donc supposer que la plante sera capable de réagir et de contrer les effets de ces métabolites toxiques. Dans le chapitre suivant, nous étudierons les effets de métabolites fongiques produits dans le milieu de culture du champignon chez différents génotypes en utilisant des cultures cellulaires.

## **Chapitre III :**

### **Mécanismes de résistance aux toxines**

## 1. Introduction

Les champignons du genre *Alternaria* sont des agents pathogènes nécrotrophes. Ces champignons produisent des toxines qui concourent à leur pouvoir pathogène en attaquant les cellules de leur hôte. Par ailleurs, chez la carotte, face à *A. dauci*, aucune résistance totale n'est connue, mais des génotypes possédant une résistance partielle sont disponibles. Parmi les hypothèses permettant d'expliquer cette résistance partielle face au champignon, nous pouvons imaginer la présence de mécanismes de résistance aux toxines produites par *A. dauci*.

Pour confirmer cette hypothèse et tenter de comprendre les mécanismes de défense de la plante face à ce champignon pathogène, nous avons mis en contact des cellules de carotte et des exsudats issus de cultures du champignon. Afin de s'affranchir d'effets de l'environnement qui peuvent influencer l'interaction entre la plante et le champignon, et de n'observer que les effets dus aux métabolites fongiques (pas d'interaction physique entre l'agent pathogène et son hôte), nous avons mis en place une expérimentation basée sur la culture *in vitro*. La carotte étant une plante modèle en culture *in vitro* et l'embryogénèse somatique de celle-ci étant maîtrisée, nous avons choisi de travailler sur des cellules embryogènes cultivées en suspension. Parallèlement, nous avons mis en culture le champignon sur un milieu liquide afin de récupérer les exsudats produits par celui-ci.

Afin de vérifier la corrélation entre la résistance d'une plante entière face au champignon et la résistance de ses cellules en suspension face à des composés toxiques produits par le champignon, nous avons utilisé six génotypes différents ayant des niveaux de résistance contrastés. Nous avons donc acquis des données sur la résistance des cellules aux composés toxiques, mais aussi des données sur la résistance de ces mêmes génotypes face au champignon, à l'échelle de la plante entière.

Dans une première partie, nous avons obtenu des données phénotypiques sur plante entière ; nous nous sommes inspirés des travaux de Boedo *et al.* (2010) basés sur l'inoculation en gouttes par *A. dauci* de feuilles de carotte non détachées et sur la quantification de la biomasse fongique par PCR en temps réel. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet d'extraits fongiques ou de zinniol obtenu par synthèse chimique sur des cellules de carotte cultivées en milieu liquide, des travaux antérieurs menés au sein de l'équipe QuaRVeg ont

servi de base à ce travail. Lorsque les cellules en suspension sont traitées avec les fractions fongiques, il faut pouvoir mesurer l'effet de ces fractions, nous avons donc mis au point différentes approches afin d'estimer l'état des cellules notamment l'observation du développement d'embryons somatiques ou l'activité enzymatique des cellules embryogènes.

Ce chapitre fera l'objet d'un article actuellement en préparation.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel biologique

#### 2.1.1. Choix des génotypes de carotte

Six génotypes de carotte ont été utilisés pour ce travail. Deux d'entre eux, Presto et Boléro, sont des variétés hybrides commerciales sélectionnées par Vilmorin ; respectivement sensible et partiellement résistante à *A. dauci*, elles sont utilisées comme références au laboratoire (Boedo, 2009 ; Boedo *et al.*, 2010 ; Le Clerc *et al.*, 2009 ; Lecomte *et al.*, 2012a ; Lecomte *et al.*, 2012b ; Pawelec, 2005 ; Pawelec *et al.*, 2006). Les quatre autres sont des génotypes sélectionnés comme parents de croisements dans le cadre d'un projet de cartographie génétique de la résistance à *A. dauci* mené au sein de l'équipe QuaRVeg. Trois génotypes partiellement résistants à *A. dauci* (K3, I2 et H4) et un génotype sensible (H1) ont été retenus. Ce travail de sélection a été réalisé dans le cadre d'un projet regroupant des laboratoires de recherche publique et des entreprises privées (projet FCE « Création Variétale Potagère » 2007-2010). Les données sur les origines de ces génotypes restent confidentielles.

#### 2.1.2. Choix de la souche d'*Alternaria dauci*

Dans le cadre du travail présenté ici, nous avons utilisé la souche P2 (référéncée FRA017 dans la collection de souches d'*A. dauci* de l'équipe FungiSem). Cette souche, isolée à partir de feuilles de carotte en 2000 en France (Gironde), possède un niveau d'agressivité intermédiaire (Boedo *et al.*, 2012) et elle est couramment utilisée au laboratoire comme souche de référence (Boedo, 2009 ; Boedo *et al.*, 2010 ; Le Clerc *et al.*, 2009 ; Lecomte *et al.*, 2012b ; Lecomte *et al.*, 2012b ; Pawelec, 2005 ; Pawelec *et al.*, 2006).

## 2.2. Données phénotypiques sur plante entière

### 2.2.1. Obtention des plantes

En serre, chaque génotype a été semé (20 semences sur une ligne, placées à 1,5 cm de profondeur et recouvertes de sable) dans une caisse (60 × 40 × 23 cm) contenant un mélange composé d' $\frac{1}{3}$  sable et de  $\frac{2}{3}$  de terreau horticole (Substrat 5, Klasmann). Une photopériode de 16 h, avec une température de 21 °C le jour et 18 °C la nuit, a été appliquée. L'arrosage a été effectué par un système de goutte à goutte avec de l'eau du robinet. Des traitements insecticides ont été réalisés si besoin pour lutter contre les attaques de pucerons et/ou de thrips.

### 2.2.2. Culture d'*Alternaria dauci* et obtention des conidies

*Alternaria dauci* a été mis en culture sur un milieu V8 agar à partir d'explants de gélose provenant d'une culture stockée à 4 °C. Les boîtes de Pétri ont été placées à 24 °C, à l'obscurité durant deux semaines, puis à 24 °C avec une photopériode de 12 heures sous lumière noire (tubes TL-D 36W BLB, Philips) durant une semaine.

Une suspension de conidies a été préparée à partir de cette culture d'*A. dauci* sur milieu solide. Quelques millilitres d'eau stérile additionnée de 0,05 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich) ont été déposés dans chaque boîte et la surface de la gélose a été raclée avec un étaloir stérile. La suspension obtenue a été filtrée au travers d'une double épaisseur de gaze, et la concentration a été calibrée à 200 conidies.mL<sup>-1</sup> suite à un comptage des conidies sur une cellule de Malassez.

La concentration de la suspension de conidies (C en CFU.mL<sup>-1</sup>) a été contrôlée en déposant 40 gouttes de 5 µL sur un milieu V8 agar et en comptant le nombre de colonies se développant. Ceci a permis de calculer le nombre de conidies viables déposées sur les feuilles lors de l'inoculation ( $N_c = C \times 40 \times 0,005$ ).

### 2.2.3. Inoculation

L'inoculation a été réalisée sur des plantes âgées de six semaines, selon le protocole d'inoculation en gouttes décrit par Boedo *et al.* (2010). La troisième feuille (F<sub>3</sub>) de cinq plantes par caisse a été placée dans une boîte de Pétri disposée sur le substrat (feuille non détachée), sur laquelle ont été déposées 40 gouttes de 5 µL d'une suspension de conidies (Fig. 22). Les plantes témoins ont été traitées avec de l'eau contenant 0,05 % de Tween 20.



Figure 22 : Inoculation en gouttes sur feuille non détachée (cliché personnel).

#### 2.2.4. Notation des symptômes

Une notation a été réalisée à 7, 9 et 13 jours après inoculation. Nous avons effectué un comptage du nombre de symptômes (Ns) apparus sur chaque feuille pour chacun des six génotypes. Une distinction a été faite entre un petit symptôme (plus petit que la goutte de suspension déposée) et un gros symptôme (plus grand que la goutte). Le ratio du nombre de lésions par conidies viables ( $S = (Ns/Nc) \times 100$ ) a été calculé à chaque date de notation.

Le calcul de l'AUDPC (Area Under Disease Progress Curve) a été réalisé selon la méthode des trapèzes (Madden *et al.*, 2007) d'où  $AUDPC = \left( \frac{(S_{7 \text{ jours}} + S_{9 \text{ jours}})}{2} \times (9 - 7) \right) + \left( \frac{(S_{9 \text{ jours}} + S_{13 \text{ jours}})}{2} \times (13 - 9) \right)$ .

Le  $\log_{10}(AUDPC)$  a également été calculé.

#### 2.2.5. Quantification de la biomasse fongique par qPCR

À partir du matériel végétal ayant servi pour les notations, les feuilles traitées précédemment ont été prélevées 15 jours après inoculation (après la dernière notation) et placées dans un tube de 15 mL puis plongées dans de l'azote liquide pour finalement être stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'ensemble des étapes permettant la quantification de la biomasse fongique (lyophilisation et broyage des échantillons, extraction des ADN, réalisation des gammes étalon, Q-PCR, analyse des Ct) ont été réalisés selon les travaux de Boedo *et al.* (2010).

Le nombre de copies de génome fongique (Nf) et le nombre de copies de génome de plante (Np) ont permis de calculer un ratio d'infection ( $I = (Nf/Np) \times 100$ ) (Berruyer *et al.*,

2006). Le calcul du  $\log_{10}(I + 1)$  a également été effectué ; l'utilisation de  $I + 1$  permet d'éviter une valeur  $\log_{10}(0) = -\infty$  lorsque le ratio  $I$  est nul, notamment pour les échantillons témoins.

### **2.2.6. Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental était composé de quatre répétitions décalées dans le temps où, pour chaque génotype et à chaque répétition, quatre feuilles ont été inoculées et une feuille a été traitée en tant que témoin.

### **2.2.7. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 2.12.2 (R Development Core Team [Internet]), en utilisant des modèles linéaires. L'homoscédasticité des paramètres (AUDPC,  $\log_{10}(\text{AUDPC})$ ,  $\log_{10}(I + 1)$ ) a été vérifiée par le test de Breusch-Pagan. La comparaison des valeurs moyennes a été effectuée à l'aide du test de comparaison multiple de Waller Duncan.

## **2.3. Obtention des filtrats de culture fongique et du zinniol**

### **2.3.1. Culture du champignon en milieu liquide**

Dans une fiole Erlenmeyer de 250 mL, 100 mL de milieu liquide à base de jus de carotte (20 % pur jus de carotte Joker®,  $\text{CaCO}_3$  3 g.L<sup>-1</sup>, eau distillée) ont étéensemencés à l'aide d'une suspension de conidies calibrée à 5.10<sup>3</sup> conidies.mL<sup>-1</sup> et préparée comme décrit au § 2.2.2. (Boedo, 2009). Au bout de 48 h de culture à l'obscurité à 24 °C sous agitation (125 rpm), le milieu a été filtré afin de ne récupérer que la partie liquide de la culture (Fig. 23).

### **2.3.2. Filtrat brut**

La culture liquide a été filtrée en utilisant successivement des membranes de nylon de 200 µm, 11 µm puis 1 µm (Sefar Nitex, Sefar Inc.). Ce filtrat brut est appelé « bA » pour filtrat brut d'*Alternaria*. Le témoin consiste en un milieu de culture (jus de carotte à 20 %) non inoculé, il est identifié comme « bC » pour filtrat brut obtenu à partir du milieu jus de carotte. Après lyophilisation (lyophilisateur Leybold-Heraens) (Fig. 23), le filtrat brut a été conservé dans un dessiccateur contenant du sulfate de calcium anhydre (Drierite™, W.A.

Hammond Drierite Co. Ltd.).

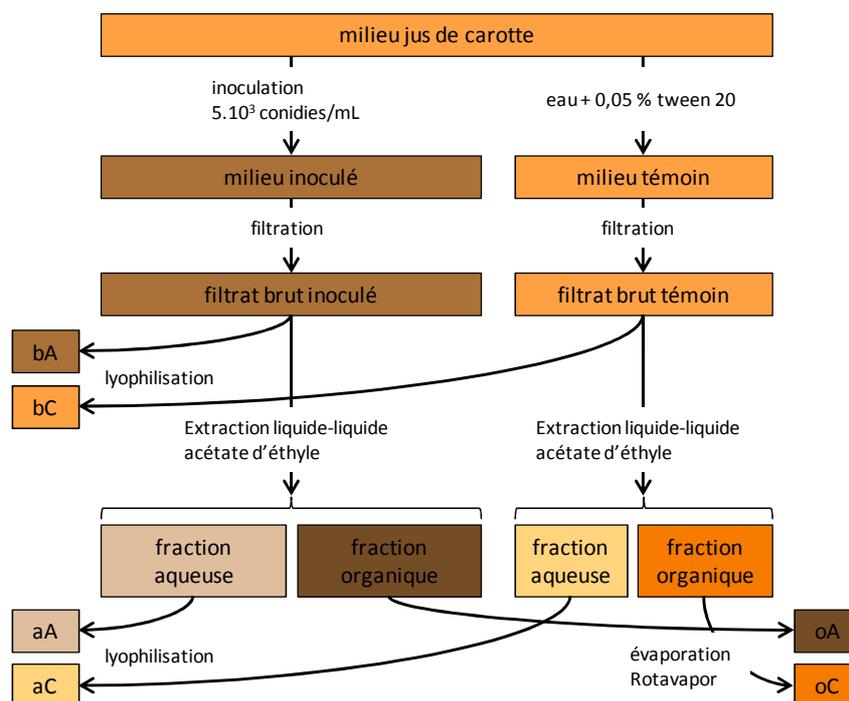


Figure 23 : Schéma d'obtention des différents extraits fongiques.

### 2.3.3. Fractions aqueuse et organique

Le pH d'une partie du filtrat brut, prélevée avant lyophilisation, a été ajusté à pH 7 puis cette fraction a subi une extraction liquide-liquide (Fig. 23) : elle a été placée dans une ampoule à décanter et un volume équivalent d'acétate d'éthyle a été ajouté, puis l'ampoule a été agitée fermement. Après décantation, lorsque deux phases sont apparues de façon bien visible, la phase aqueuse (phase inférieure) a été récupérée dans une fiole Erlenmeyer et la phase organique (phase supérieure) dans une seconde fiole Erlenmeyer. La phase aqueuse a été ré-extraite deux fois de la même façon. Les trois fractions de phase organique ont été rassemblées, quelques grammes de sulfate de magnésium anhydre ont été ajoutés afin de piéger les traces d'eau restantes, puis l'ensemble a été filtré au travers d'un morceau de laine de verre (laine de verre extra-fine 11  $\mu\text{m}$ , Hecht Assistant).

La fraction aqueuse nommée « aA » (« aC » pour le témoin) a été lyophilisée et conservée dans les mêmes conditions que le filtrat brut (Fig. 23).

La fraction organique nommée « oA » (« oC » pour le témoin) a été séchée dans un ballon par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavator R) à température ambiante (Fig. 23). Le résidu a été stocké dans un tube en verre à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.4. Synthèse, dosage et stabilité du zinniol

#### 2.3.4.1. Synthèse

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire SONAS (Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux) de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé de l'Université d'Angers, la synthèse chimique du zinniol ( $C_{15}H_{22}O_4$ ,  $266,33 \text{ g.mol}^{-1}$ ) a été effectuée à partir des travaux de Martin et Vogel (1980), selon le schéma réactionnel suivant (Fig. 24).

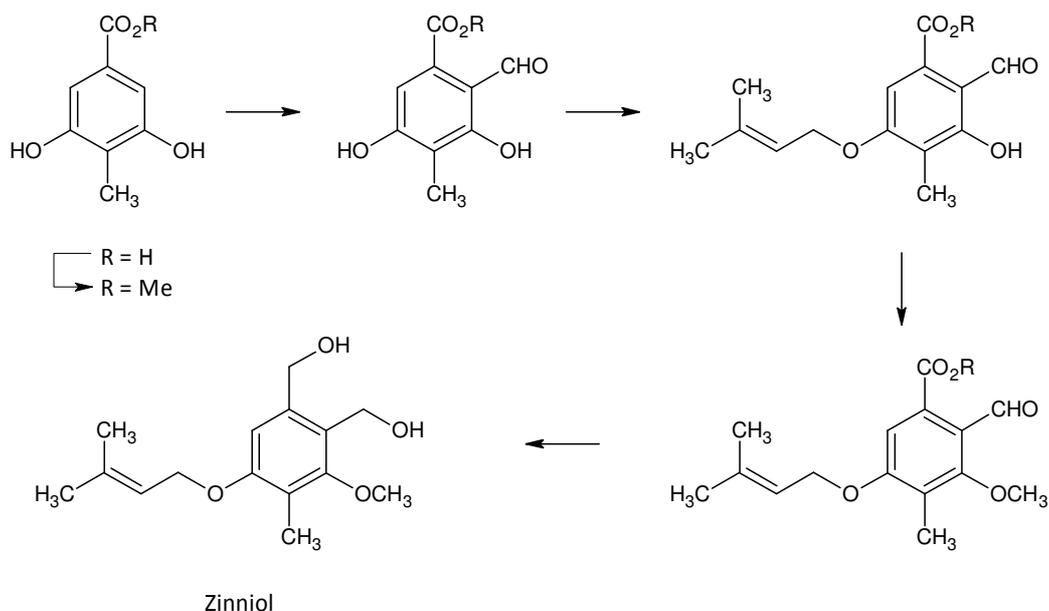


Figure 24 : Schéma réactionnel de la synthèse chimique du zinniol (d'après Martin et Vogel, 1980).

#### 2.3.4.2. Détection et dosage

Une méthode analytique CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) a été développée à l'aide d'un matériel de type Waters Alliance 2695, équipé d'un détecteur à barrette de diode avec un enregistrement sur la gamme 210 nm-600 nm. La séparation est réalisée sur une colonne analytique en phase inverse C18 (Uptishere UP3ODB-15QK  $150 \times 4,6 \text{ mm } 3\mu\text{m}$ ). La phase mobile est un mélange binaire d'eau (solvant A) et de méthanol (solvant B) selon un mode gradient :  $t = 0$ , A/B = 40/60 ;  $t = 5 \text{ min}$ , A/B = 40/60 ;  $t = 15 \text{ min}$ , A/B = 0/100 ;  $t = 25 \text{ min}$ , A/B = 0/100 ;  $t = 30 \text{ min}$ , A/B = 40/60 ;  $t = 40 \text{ min}$ , A/B = 40/60. Le traitement des chromatogrammes est réalisé à l'aide du logiciel Empower 5.0.

#### 2.3.4.3. Stabilité

Lors d'analyses du zinniol obtenu par synthèse totale, des phénomènes de dégradation ont été mis en évidence. Nous avons montré qu'ils dépendent notamment du solvant utilisé, du pH et de la température. Nous avons alors souhaité étudier la stabilité du zinniol dans le

milieu de culture cellulaire utilisé pour les tests *in vitro*.

Du milieu de culture pour suspension cellulaire (milieu de culture sans régulateurs de croissance, cf. § 2.4.2.) additionné de zinniol (7,4 mg solubilisé dans 200  $\mu\text{L}$  de DMSO) a été placé dans les conditions de culture des suspensions (22°C, sous agitation, à l'obscurité). La concentration initiale de zinniol dans le milieu étant connue (1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), des prélèvements de ce milieu ont été réalisés à différents moments (T0, + 6h, + 12h, + 24h, + 48h, + 96h, + 192h). Chaque échantillon du milieu a été prélevé stérilement et immédiatement placé dans de l'azote liquide puis stocké à -80°C. À la fin des prélèvements, tous les échantillons ont été analysés par CLHP et la quantité de zinniol a été évaluée.

Trois injections de 20  $\mu\text{L}$  ont été réalisées pour chaque échantillon. Le pic correspondant au zinniol a été intégré pour chaque chromatogramme et la valeur de son intégration recalculée sur une base 100 (T0 = 100 %).

## 2.4. Obtention des suspensions cellulaires de carotte

### 2.4.1. Introduction de plantes *in vitro* et obtention de cals friables

À partir d'une dizaine de plantes de chaque génotype, cultivées en serre comme décrit au § 2.2.1., trois individus par génotype ont été introduits en culture *in vitro*. Des sections de pétiole d'environ 5 cm, prélevées sur des plantes adultes, ont été désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 9 % de chlore actif. Les explants ont ensuite été coupés en morceau de 1 cm, puis mis en culture à l'obscurité à 23 °C sur le milieu de Gamborg solide (Gamborg *et al.*, 1968 ; Gamborg *et al.*, 1976 ; cf. Annexe 1) additionné de 0,1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) en vue de l'obtention d'un cal embryogène friable. Les cals obtenus ont été repiqués sur le même milieu de culture toutes les six semaines.

### 2.4.2. Culture des cellules en milieu liquide

Ces cals friables ont ensuite été transférés (à raison de 1 g de cal dans 25 mL) dans des flacons de culture cellulaire (BD Falcon) contenant 25 mL de milieu de Gamborg liquide additionné de 2,4-D (0,25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et de kinétine (0,05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Ces cultures liquides ont été placées à 22 °C à l'obscurité, sous une agitation permanente (125 rpm). Après trois semaines de culture, les cellules en suspension ont été séparées du cal et du milieu de culture par filtration (tamis de laboratoire  $\varnothing$  45 mm, ouvertures de 450  $\mu\text{m}$ , Saulas) et retenues sur une membrane de nylon (Sefar Nitex, porosité 50  $\mu\text{M}$ , Sefar Inc.). Les cellules ont alors été remises en suspension dans 25 mL de milieu Gamborg liquide contenant 0,25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D et 0,05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de kinétine.

Après deux nouvelles semaines de culture, les suspensions ont été à nouveau filtrées au

travers de membranes de nylon. Seules les cellules dont la taille était comprise entre 25  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$  ont été récupérées et ont été remises en suspension dans un volume de 10 mL de milieu de Gamborg sans régulateurs de croissance (noté milieu –RC). Les cellules ont été laissées ainsi toute une nuit dans les conditions de culture précédentes avant d’être utilisées, afin qu’elles se stabilisent suite au changement de milieu.

## **2.5. Traitement des cellules par les fractions fongiques**

### ***2.5.1. Préparation des fractions et du zinniol***

Les fractions lyophilisées obtenues précédemment ont été dissoutes dans du milieu Gamborg –RC. Le volume de milieu Gamborg –RC ajouté correspond à la quantité d’eau évaporée lors de la lyophilisation ; la concentration obtenue est ainsi la même que dans la culture de champignon du départ.

Concernant les fractions organiques, celles-ci ont d’abord été re-solubilisées avec quelques microlitres de DMSO (diméthylsulfoxyde), puis comme précédemment avec du milieu Gamborg –RC afin d’obtenir la concentration d’origine. La quantité de DMSO utilisée se limite à 0,4 % du volume des fractions afin de ne pas dépasser 0,1 % dans le milieu final contenant les cellules.

Une solution de zinniol à 2 mM a été préparée de la même façon que les fractions organiques (0,4 % DMSO, milieu Gamborg –RC).

Pour l’ensemble de ces solutions, le pH a été ajusté à 5,8, ce qui correspond au pH du milieu Gamborg seul, puis elles ont été stérilisées par filtration (filtre stérile pour seringue, acétate de cellulose, porosité 0,45  $\mu\text{m}$ , VWR).

### ***2.5.2. Traitement des cellules***

Pour le traitement des cellules, nous avons utilisé des plaques comportant 12 puits (plaques pour culture cellulaire, fond plat, BD Falcon). Dans chaque puits, 1 mL de suspension cellulaire (resuspendue dans le milieu Gamborg –RC) a été prélevé stérilement. Pour chacun des puits, 0,1 (5 %) ou 0,5 mL (25 %) de la fraction à tester (cf. §2.5.1.) ont été ajoutés, puis le volume a été complété à 2 mL avec du milieu Gamborg –RC. Trois concentrations de zinniol (0,025  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$ ) ont également été appliquées à partir de la solution à 2 mM.

Les suspensions témoins sont composées de 1 mL de suspension cellulaire et de 1 mL de milieu Gamborg –RC seul. Les témoins contenant du DMSO (pour les fractions organiques et le zinniol) sont obtenus par addition de 1 mL de milieu Gamborg –RC contenant 0,2 % de DMSO (0,1 % dans la solution finale contenant les cellules).

Ces suspensions cellulaires ont ensuite été replacées en chambre de culture à 22 °C à l'obscurité, sous une agitation permanente (125 rpm). Tous les sept jours, 300 µL de milieu Gamborg –RC contenant 25 % d'extrait fongique sont ajoutés au traitement correspondant.

## **2.6. Évaluation de la toxicité des fractions fongiques sur les cellules de carotte**

### ***2.6.1. Suivi de la conversion des cellules en embryons somatiques***

Suite au traitement des suspensions cellulaires dans les plaques, ces dernières ont été laissées en chambre de culture et nous avons observé l'évolution des cultures et notamment le développement des embryons somatiques. Ces embryons somatiques se forment spontanément lorsque des cellules embryogènes sont transférées dans un milieu dépourvu de 2,4-D. Le suivi de la formation des embryons somatiques à partir des cellules embryogènes, nous permet d'évaluer l'aptitude des cellules à exprimer leur totipotence en présence d'un traitement ou non. La formation d'embryons a été observée sous loupe binoculaire (embryons jeunes) et à l'œil nu, entre deux et quatre semaines après traitement.

### ***2.6.2. Aspects microscopiques des cellules***

#### **2.6.2.1. Tests de viabilité cellulaire : bleu Evans et fluorescéine diacétate**

Le test de coloration avec le bleu Evans met en évidence les cellules mortes et les cellules vivantes. En effet, après ajout du colorant sur les suspensions cellulaires, seules les cellules vivantes sont capables d'exclure le colorant et apparaissent blanches alors que les cellules mortes et endommagées laissent passer le colorant et deviennent bleues. Pour ce test, 100 µL de suspension cellulaire ont été mis en contact avec 20 µL de bleu Evans 1 % (100 mg dans 10 mL d'eau distillée), l'observation s'est effectuée sous microscope.

L'utilisation de la fluorescéine diacétate (FDA) révèle également les cellules vivantes. La FDA pénètre dans les cellules où elle est hydrolysée par les enzymes cellulaires et forme alors un composé, la fluorescéine, qui émet une fluorescence verte lorsqu'elle est excitée par une lumière incidente de longueur d'onde 485 nm. Pour ce test, 100 µL sont prélevés, auxquels est ajouté 1 µL de FDA à 1 mM. Après 5 min d'incubation à l'obscurité, l'observation se fait sous microscope à fluorescence.

#### **2.6.2.2. Observation des noyaux : test avec le DAPI**

Selon le même principe que précédemment, les cellules ont été mises en contact avec le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) qui marque l'ADN. Le DAPI est une molécule

fluorescente qui se lie fortement à l'ADN. Au microscope à fluorescence, si les cellules sont excitées par de la lumière UV (350 nm), on observe une fluorescence bleue brillante au niveau du noyau. Ce test renseigne sur l'état du noyau et sur les dommages causés à l'ADN (Qui *et al.*, 2010).

### **2.6.3. Utilisation de l'activité hydrolytique intracellulaire comme marqueur de la toxicité**

#### **2.6.3.1. Extraction des enzymes**

Après 48 h de traitement en présence des fractions fongiques, 1 mL de suspension de cellules traitées a été prélevé. Ces cellules ont été centrifugées à 1 800 g à température ambiante afin d'éliminer le milieu de culture puis lavées avec un tampon phosphate à 50 mM (pH 8,75), et de nouveau centrifugées à 7 200 g à température ambiante. Le culot cellulaire, additionné de sable de Fontainebleau, a ensuite été broyé à l'aide d'un broyeur à bille dans de l'azote liquide puis repris dans 200  $\mu$ L de tampon phosphate à 250 mM (pH 8,75) contenant 1 mM de dithiothréitol (DTT). Après une centrifugation à 10 000 g à 4 °C, l'extrait enzymatique ainsi obtenu a été plongé immédiatement dans de l'azote liquide et stocké à -20 °C (adaptation du protocole de Vitecek *et al.*, 2007).

#### **2.6.3.2. Réaction enzymatique**

La réaction enzymatique s'est déroulée dans une plaque noire à fond plat de 96 puits (Greiner Bio-One). Vingt microlitres d'extrait enzymatique ont été mélangés à 277  $\mu$ L de tampon phosphate 1 M (pH 8,75) et à 3  $\mu$ L de solution de FDA à 0,5 mM préparée extemporanément dans de l'acétone à partir d'une solution stock à 1 mg.mL<sup>-1</sup> conservée au froid à -80°C.

Le produit formé par cette réaction, la fluorescéine, a été mesuré par détection de la fluorescence (excitation : 485 nm ; émission : 520 nm) dans un fluorimètre à plaque (FLUOstar Omega, BMG Labtech). La fluorescence de chaque puits a été mesurée toutes les minutes pendant 90 min (mesure en cinétique) à une température de 45 °C. Une gamme étalon de fluorescéine (Sigma-Aldrich), comportant 10 concentrations allant de 0 à 7  $\mu$ M dans un tampon phosphate à 1 M à pH 8,75, a été réalisée à partir d'une solution mère à 1 mg.mL<sup>-1</sup> dans de l'acétone.

#### **2.6.3.3. Dosage de protéines**

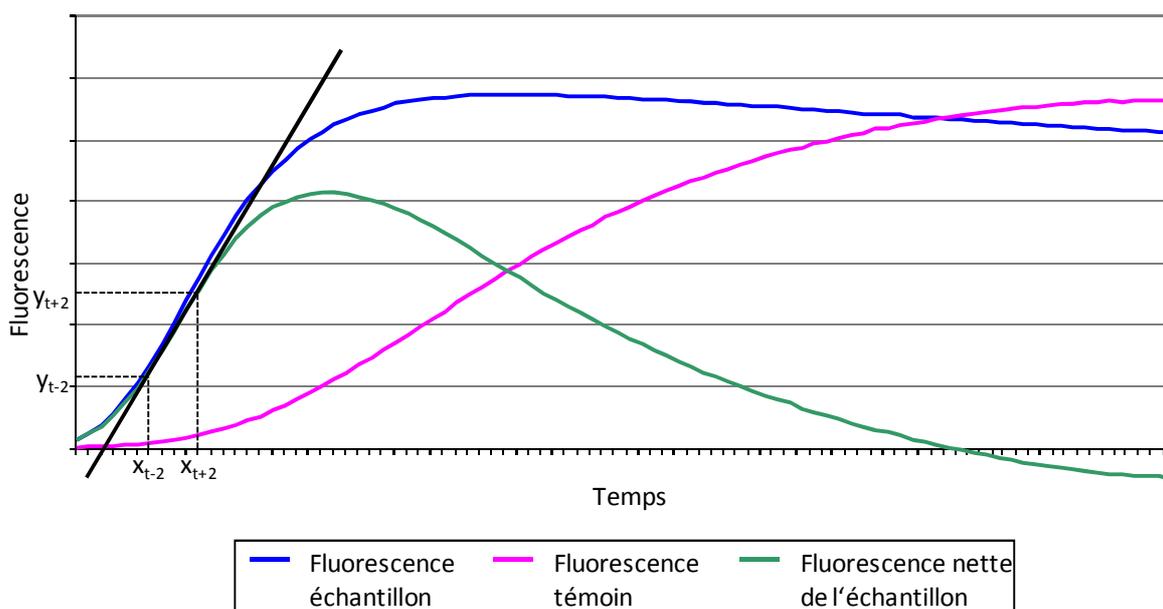
Pour chaque échantillon, la quantité de protéines totales a également été mesurée. Dans une plaque de 96 puits (plaques microtitration, fond plat, Greiner Bio-One), 120  $\mu$ L de réactif de Bradford (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés à 30  $\mu$ L d'extrait. L'absorbance a été mesurée à 595 nm sur le même appareil que précédemment, paramétré pour la mesure de l'absorbance.

Une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich), à partir d'une solution mère à 10 mg.mL<sup>-1</sup> dans de l'eau ultra-pure, a été réalisée (8 concentrations allant de

0 à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> dans un tampon phosphate à 250 mM à pH 8,75 additionné de DTT à 1 mM).

#### 2.6.3.4. Calcul de l'activité enzymatique spécifique

Pour chaque échantillon, à chaque point de mesure de fluorescence, la vitesse de la réaction d'hydrolyse de la FDA a été calculée en prenant en compte les valeurs à  $t-2$  min et à  $t+2$  min (pente au point  $t = (y_{t-2} - y_{t+2}) / (x_{t-2} - x_{t+2})$ ). La valeur de la vitesse maximale de la réaction au niveau de la phase linéaire, correspondant à la pente maximale de la courbe de formation de la fluorescéine, a ainsi été calculée (Fig. 25).



**Figure 25 :** Détermination de la vitesse de réaction d'hydrolyse de la FDA. Le calcul est effectué sur les valeurs de fluorescence nette c'est-à-dire les valeurs de fluorescence de l'échantillon corrigées par les valeurs de fluorescence des témoins.

L'activité enzymatique spécifique (en  $\mu\text{mol}$  de fluorescéine formée/min/mg de protéines) a été calculée à partir de cette vitesse maximale et de la quantité de protéines.

Pour chaque traitement, l'effet a été déterminé en calculant le ratio entre l'activité spécifique de l'échantillon traité et l'activité spécifique du témoin correspondant. Considérant que le témoin correspond à 100 % de l'activité observée et qu'il possède un effet nul, l'ensemble des effets ont été ramenés sur une base « 0 » (Effet = ratio - 100 %).

#### 2.6.3.5. Dispositif expérimental

Pour cette quantification de l'activité hydrolytique intracellulaire, chaque extrait a été mesuré trois fois pour la fluorescence et trois fois pour la quantité de protéines ; nous avons donc, pour chaque extrait, calculé une valeur d'activité enzymatique spécifique à partir des valeurs moyennes de fluorescence et de quantité de protéines.

Un extrait est issu d'un puits de la plaque de culture constituant une répétition d'une condition donnée (chaque condition étant répétée trois fois dans une plaque de culture). Nous avons donc calculé trois valeurs d'effet pour chacun des traitements ; ces effets ont été calculés à partir de l'activité enzymatique spécifique de chaque extrait et de la valeur de l'activité enzymatique spécifique moyennée des trois extraits témoins.

Au final, nous avons testé six génotypes, avec neuf conditions différentes répétées trois fois (trois expérimentations décalées dans le temps) Par ailleurs, pour chaque expérimentation, nous avons utilisé une culture cellulaire indépendante, nous avons donc intégré à chaque fois un témoin négatif et un témoin DMSO (milieu Gamborg –RC, 0,1 % de DMSO) pour les fractions organiques et les solutions de zinniol.

#### **2.6.3.6. Traitements statistiques**

Les tests de comparaisons multiples (test LSD de Fisher) ont été réalisés avec STATGRAPHICS® Centurion XV (StatPoint, Inc.). Au moins trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque traitement, les valeurs présentées correspondent à des moyennes accompagnées d'écart-types (SD).

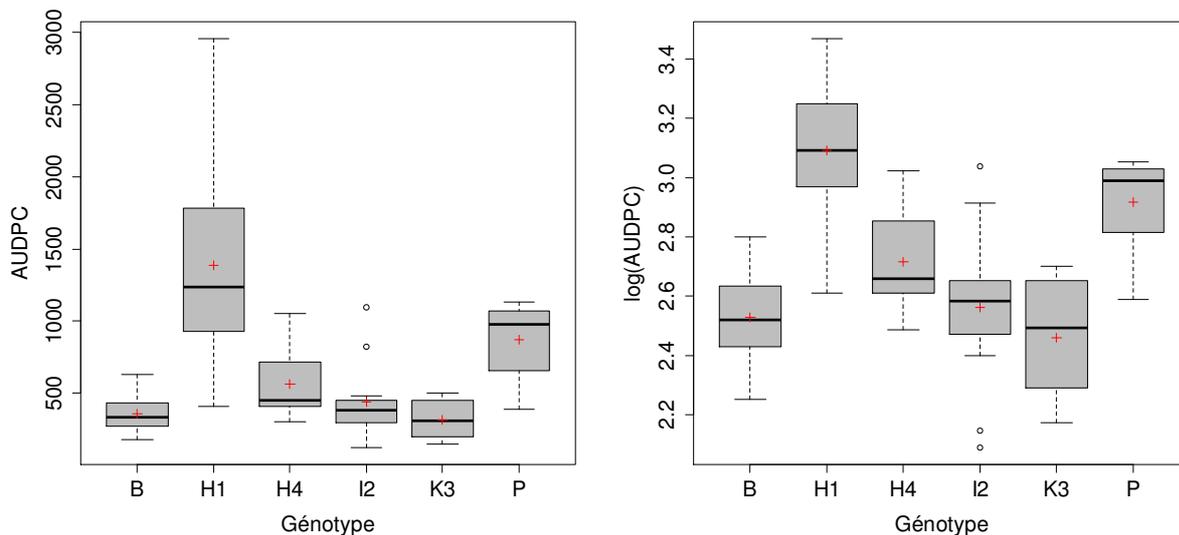
## 3. Résultats

### 3.1. Données phénotypiques sur plante entière

#### 3.1.1. Notations visuelles des symptômes

Les statistiques descriptives utilisées, indiquent que l'utilisation de l'AUDPC est plus adaptée que l'utilisation du ratio du nombre de lésions par conidie, que ce soit pour chacune des dates prises séparément ou pour le ratio moyen (données non présentées).

La quantité de symptômes observés pour chacun des génotypes peut être représentée graphiquement par un boxplot (ou boîte à moustache) (Fig. 26).



**Figure 26 :** Boxplot de l'AUDPC et du  $\log(\text{AUDPC})$  en fonction du génotype. La barre noire horizontale représente la médiane, la croix rouge la moyenne, la base de la boîte le 1<sup>er</sup> quartile et le haut de la boîte le 3<sup>e</sup> quartile.

On observe que, pour une médiane ayant une valeur faible, la dispersion autour de cette

médiane est également faible, et inversement. En revanche, avec le  $\log(\text{AUDPC})$ , la dispersion est relativement homogène entre les différents génotypes.

K3 est le génotype possédant la valeur moyenne la plus faible, c'est-à-dire une quantité de symptômes observée la plus faible. H1 est celui qui, au contraire, a la valeur la plus élevée. Par ailleurs, il n'y a pas d'effet répétition (date de semis) sur les données ; les médianes et leur dispersions sont équivalentes (données non présentées).

À partir des valeurs de l'AUDPC et du  $\log(\text{AUDPC})$ , nous avons réalisé une analyse de variance en utilisant des modèles linéaires avec les facteurs 'génotype', 'répétition', 'génotype + répétition' et 'génotype + répétition + génotype\*répétition'. L'AUDPC ne montre pas d'homoscédasticité, les modèles écrits ne sont donc pas valables. En revanche, le  $\log(\text{AUDPC})$  montre une homoscédasticité (test de Breuch-Pagan au seuil  $\alpha = 0,01$ ).

Au seuil  $\alpha = 0,01$ , les modèles linéaires n'indiquent pas d'effet de la répétition, ni d'effet d'interaction génotype\*répétition. Le modèle linéaire 'lm =  $\log(\text{AUDPC}) \sim$  génotype' indique donc que l'effet observé est dû au génotype, par conséquent que l'on observe bien des niveaux différents de résistance à *A. dauci*.

On distingue quatre classes de niveau de résistance (Tab. IV). H1 est le génotype le plus sensible, significativement plus sensible que Presto lui-même significativement plus sensible que tous les autres. K3 est le plus résistant, il est dans le même groupe que Boléro. Ce groupe de génotypes résistants se distingue de H1, Presto et H4. Ce dernier et I2 constituent des classes de résistance intermédiaires.

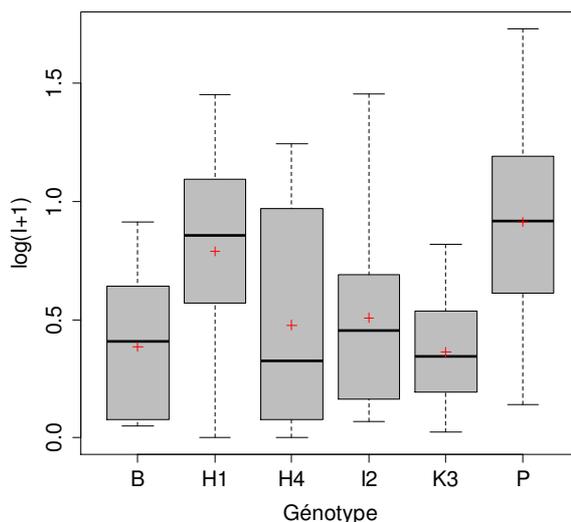
**Tableau IV :** Classement des génotypes en fonction du  $\log(\text{AUDPC})$ . Les groupes de comparaison sont définis par le test de Waller-Duncan. Les moyennes correspondent aux valeurs moyennes du  $\log(\text{AUDPC})$ . Les génotypes possédant la même lettre ne sont pas significativement différents.

Groupes	Génotypes	Moyennes
a	H1	3.093187
b	P	2.918167
c	H4	2.714333
cd	I2	2.562364
d	B	2.529333
d	K3	2.460067

### 3.1.2. Quantification de la biomasse fongique par qPCR

Nous avons effectué les mêmes analyses que précédemment. Le  $\log(I+1)$  permet la meilleure description des données (données non présentées).

À partir de l'analyse de la dispersion des valeurs (Fig. 27), on remarque que cette dispersion est plus importante que pour les valeurs du  $\log(\text{AUDPC})$ , notamment pour le génotype H4. Comme précédemment, il n'y a pas d'effet répétition sur ces données (données non présentées).



**Figure 27 :** Boxplot du  $\log(I+1)$  en fonction du génotype. La barre noire horizontale représente la médiane, la croix rouge la moyenne, la base de la boîte le 1<sup>er</sup> quartile et le haut de la boîte le 3<sup>e</sup> quartile.

Des modèles linéaires ont été utilisés comme précédemment (cf. §3.1.1.). Ceux-ci révèlent, au seuil  $\alpha = 0,01$ , seulement un effet du génotype sur la biomasse du champignon. Trois groupes peuvent être distingués (Tab. V) : Presto est le génotype sur lequel le champignon s'est le plus développé (c'est-à-dire le génotype le plus sensible), il n'est pas significativement différent de H1. En revanche, K3, Boléro et H4 se retrouvent dans le même groupe qui lui se distingue des deux génotypes les plus sensibles (Presto et H1).

**Tableau V :** Classement des génotypes en fonction du  $\log(I+1)$ . Les groupes de comparaison sont définis par le test de Waller-Duncan. Les moyennes correspondent aux valeurs moyennes du  $\log(I+1)$ . Les génotypes possédant la même lettre ne sont pas significativement différents.

Groupes	Génotypes	Moyennes
a	P	0.9125833
ab	H1	0.787875
bc	I2	0.5074167
c	H4	0.4773333
c	B	0.3851667
c	K3	0.3606875

### 3.1.3. Comparaison des deux méthodes

Deux méthodes de phénotypage sur plante entière ont été utilisées. Le comptage des symptômes permet de distinguer quatre classes de résistance au lieu de trois avec la quantification de la biomasse fongique. On peut tout de même remarquer une bonne corrélation entre les deux méthodes (Fig. 28) : globalement, les génotypes présentant le moins

de symptômes (valeur  $\log(\text{AUDPC})$  faible) sont ceux chez lesquels le champignon se développe le moins (valeur  $\log(I+1)$  faible). Mais nous pouvons également remarquer que le classement des génotypes en fonction de leur résistance est un peu modifié entre les deux méthodes. On observe notamment que H1 est le génotype le plus sensible du point de vue du nombre de symptômes, mais ce n'est pas le génotype sur lequel nous détectons le plus de biomasse fongique.

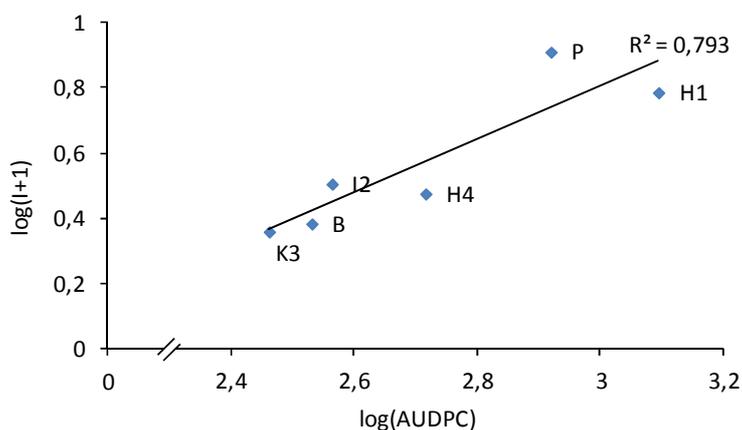


Figure 28 : Corrélation entre le  $\log(I+1)$  et le  $\log(\text{AUDPC})$ .

## 3.2. Résistance aux fractions fongiques et au zinniol

### 3.2.1. Mises au point méthodologiques

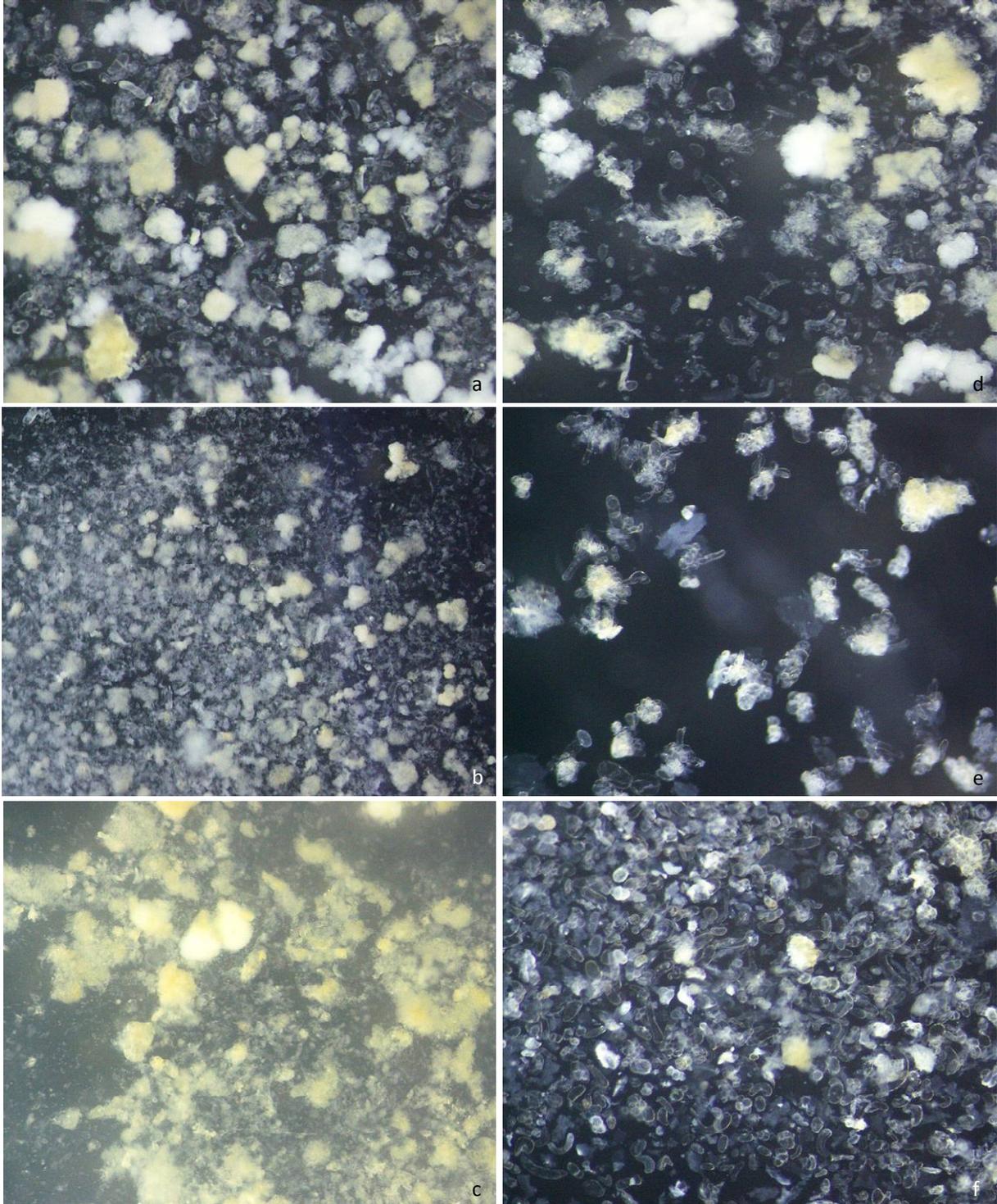
Des études préliminaires ont été nécessaires pour déterminer les paramètres les plus favorables à la culture des suspensions cellulaires embryogènes de carotte, notamment l'équilibre hormonal permettant d'obtenir des cellules à potentiel embryogène (données non présentées, stage de Master 1 de N. Turnbull (2009)). La méthode utilisée pour traiter ces cellules avec les extraits fongiques et en mesurer les effets, a elle aussi fait l'objet d'un travail de mise au point (données non présentées, stage de Master 2 de M. Gyomlai (2010)). Ces travaux ont été complétés par de nouvelles phases de mise au point qui se sont concrétisées par la définition de méthodes de mesure de l'effet d'extraits fongiques sur les cellules.

Le traitement des cellules en suspension a été réalisé avec deux concentrations d'extraits fongiques : 5 et 25 % d'extrait dans le milieu de culture des cellules. Dès les premiers essais, les résultats obtenus avec 5 % d'extrait n'ont pas permis d'observer d'effets significatifs en comparaison avec la condition 25 % d'extrait (données non présentées). Pour la suite, seuls les résultats obtenus avec 25 % seront exposés (sauf lorsque le contraire est précisé).

### 3.2.2. Résultats des tests in vitro

#### 3.2.2.1. Aspects macroscopiques

##### Effet du filtrat brut



**Figure 29 :** Observations sous loupe binoculaire des suspensions de cellules de carotte après 15 jours de traitement avec le filtrat brut. (a) H1 témoin ; (b) H1 bC 25% ; (c) H1 bA 25% ; (d) K3 témoin ; (e) K3 bC 25% ; (f) K3 bA 25%. bA = filtrat brut d'*Alternaria* ; bC = filtrat brut obtenu à partir du milieu jus de carotte non inoculé.

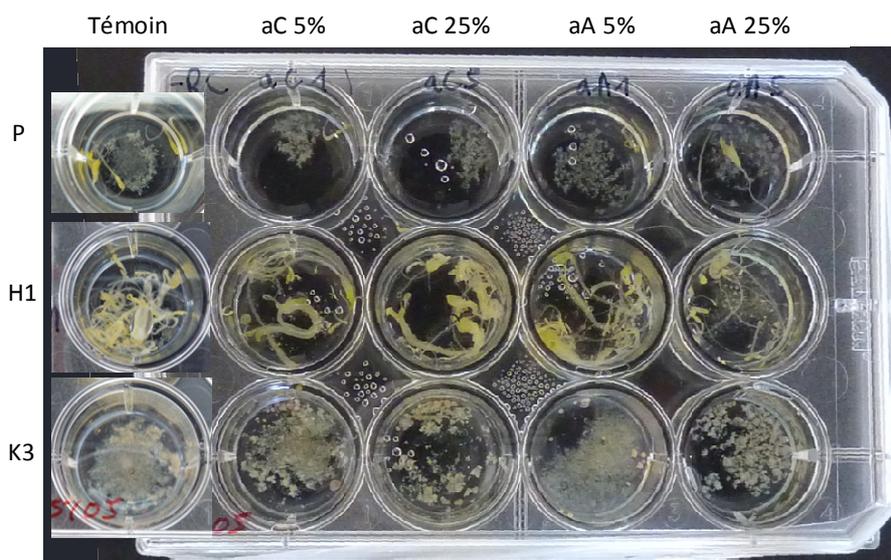
Chez le génotype sensible H1, les cellules montrent un état de plasmolyse lorsqu'elles sont traitées avec l'extrait bC (extrait issu du milieu non inoculé) (Fig. 29b). De plus, la conversion des cellules en embryons semble avoir un retard par rapport au témoin. Concernant les cellules traitées avec l'extrait fongique (bA), l'effet est très marqué, les cellules sont très affectées et on observe un grand nombre de débris cellulaires (Fig. 29c). Il y a également un fort effet sur la conversion en embryons, où celle-ci semble être fortement ralentie, voire inhibée.

Concernant le génotype résistant K3, l'état des cellules traitées avec l'extrait bA est assez proche de l'état des cellules du milieu témoin. De même, la conversion en embryons ne semble que peu affectée par le traitement (Fig. 29f).

Ces tests avec le filtrat brut ont été répétés trois fois, les observations vont toutes dans le même sens à savoir : nous observons un effet de l'extrait bC sur le génotype sensible H1, mais cet effet est bien plus important avec l'extrait bA ; nous avons donc bien un effet toxique de l'extrait fongique sur les cellules du génotype sensible. L'effet mis en évidence ici n'est pas observé chez le génotype résistant K3.

Ce test a été réalisé sur l'ensemble des six génotypes ; les trois autres génotypes résistants (Boléro, I2 et H4) ont un comportement comparable à K3 et le deuxième génotype sensible (Presto) a répondu de façon similaire à H1. Nous sommes donc capables de différencier un génotype sensible d'un génotype résistant sur la base de leur comportement face aux extraits bruts du champignon.

### Effet de la fraction aqueuse



**Figure 30** : Développement d'embryons à partir des suspensions de Presto (P), H1 et K3 après quatre semaines de traitement avec la fraction aqueuse. aA = fraction aqueuse de l'extrait d'*Alternaria* ; aC = fraction aqueuse du milieu jus de carotte non inoculé.

Quelle que soit la fraction (aC ou aA) et la concentration utilisée, les génotypes répondent de la même façon ; on note, pour un génotype donné par rapport à son témoin, un développement d'embryons dans tous les puits de façon similaire (Fig. 30). Par exemple, chez le génotype Presto, même s'il forme assez peu d'embryons en conditions normales (cf. témoin), on observe un développement d'embryons pour l'ensemble des traitements appliqués. Concernant H1 et K3, le développement d'embryons est plus important que chez Presto, mais comparable quel que soit le traitement chez ces deux génotypes.

Cette expérience a été renouvelée deux autres fois et donne à chaque fois la même information quel que soit le génotype. L'effet mis en évidence auparavant avec l'extrait brut n'est pas retrouvé ici. La cause de l'effet observé avec l'extrait brut ne se retrouve donc pas dans la fraction aqueuse de notre extrait fongique.

#### Effet de la fraction organique

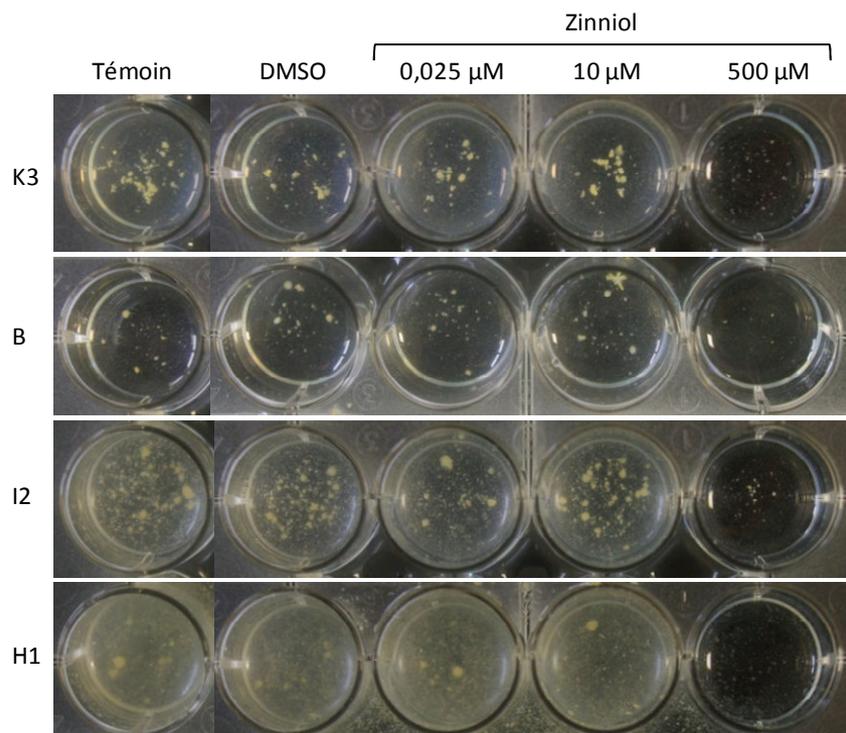
Le génotype sensible H1 mis en contact avec la fraction oA ne forme plus d'embryons et les cellules de ce dernier sont abimées (débris cellulaires importants). On observe également un effet, mais moins marqué, de la fraction oC par rapport au témoin, de la même manière que lors du traitement avec l'extrait bC. En revanche, la conversion en embryons est toujours observée chez le génotype K3 quelle que soit la fraction utilisée (Témoin, DMSO, oC ou oA). Les résultats obtenus avec la fraction organique sont similaires à ceux mis en évidence avec le filtrat brut, sur les six génotypes (photographie des résultats non présentée).

Cette expérience nous indique que les composés toxiques responsables des effets observés avec le filtrat brut se trouvent dans cette fraction organique.

#### Effet du zinniol

Concernant le zinniol, nous avons observé un effet de celui-ci à la concentration de 500  $\mu\text{M}$  sur tous les génotypes, y compris K3. Les suspensions traitées subissent à la fois une diminution de la division cellulaire et une inhibition de la conversion en embryons (Fig. 31).

Les autres concentrations (0,025  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$ ) n'ont quant à elles aucun effet, quel que soit le génotype (Fig. 31).



**Figure 31 :** Développement d'embryons à partir des suspensions cellulaires après trois semaines de traitement avec différentes concentrations de zinniol. DMSO = milieu Gamborg additionné de 0,1 % de DMSO.

### Synthèse des résultats

L'ensemble des observations sur la division cellulaire et le développement d'embryons somatiques est résumé dans le tableau ci-dessous (Tab. VI). D'un point de vue général, une variabilité dans la propension à former des embryons somatiques (cf. témoins) existe entre les six génotypes. Mais, malgré cette variabilité, on remarque que, selon le génotype, cette propension est plus ou moins affectée par les traitements appliqués. Il existe donc une variabilité des génotypes dans leur réaction face à ces traitements.

Le filtrat brut bA affecte particulièrement les génotypes H1 et Presto qui, comme nous l'avons montré dans le paragraphe 3.1., sont les deux génotypes les plus sensibles à *A. dauci*. Les génotypes définis comme résistants par les données phénotypiques sur plante entière, sont ici capables de former des embryons malgré la présence d'extrait fongique. Notons également le comportement intermédiaire de H4 qui ne forme pas d'embryons, mais dont les cellules restent viables et continuent de se diviser ; face au champignon, ce génotype a également un niveau de résistance intermédiaire au niveau de la plante entière.

Suite au traitement des cellules des six génotypes avec la fraction aqueuse aA, on ne retrouve pas l'effet observé avec le filtrat brut ; l'ensemble des génotypes est capable de former des embryons même en contact avec des composés d'origine fongique présents dans la fraction aqueuse. Le ou les composés responsables du phénomène observé avec le filtrat brut ne sont donc pas présents dans la fraction aqueuse de l'extrait d'*A. dauci*.

L'application de la fraction organique oA provoque les mêmes effets que le filtrat brut. Les génotypes sensibles au filtrat brut, le sont également à la fraction organique. On observe également que les génotypes formant des embryons malgré le traitement avec le filtrat brut, forment également des embryons en présence de la fraction organique. On observe donc le même différentiel de résistance à des composés fongiques entre le traitement avec le filtrat brut et le traitement avec la fraction organique. Le ou les éléments responsables des effets observés sont donc présents dans cette fraction.

Concernant le zinniol, aux concentrations de 0,025  $\mu\text{M}$  et de 10  $\mu\text{M}$ , il n'y a pas d'effet observé quel que soit le génotype. En revanche, à 500  $\mu\text{M}$ , tous les génotypes sont affectés dans la division cellulaire et la conversion en embryons ; chez I2 et K3, de rares embryons parviennent parfois à se développer suite au traitement.

**Tableau VI :** Synthèse des observations macroscopiques des suspensions cellulaires traitées avec les différentes fractions fongiques et le zinniol.

Génotype	Traitement										
	Témoin		Filtrat brut		Fraction aqueuse		Fraction organique		Zinniol		
	T-	DMSO	bA	bC	aA	aC	oA	oC	0,025 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$
<b>Boléro</b>											
Div	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Conv	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	-
<b>H1</b>											
Div	++	++	-	+	++	++	-	+	++	++	-
Conv	++	+	-	+	++	++	-	+	+	+	-
<b>H4</b>											
Div	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Conv	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-/+	-
<b>I2</b>											
Div	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	-
Conv	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+
<b>K3</b>											
Div	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	-
Conv	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-/+
<b>Presto</b>											
Div	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Conv	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-

Div : division cellulaire

Conv : formation d'embryons

- : absente ; + : faible ; ++ : moyenne ; +++ : importante

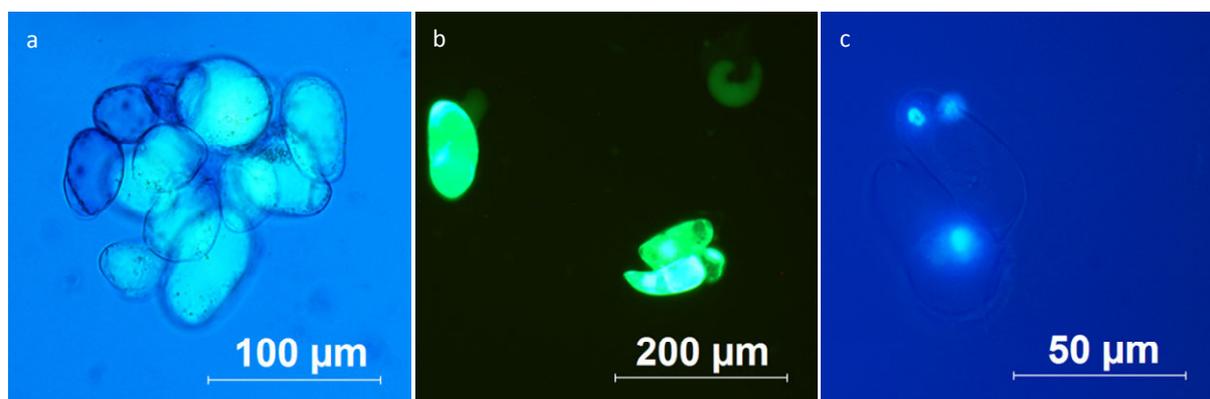
### 3.2.2.2. Aspects microscopiques

Dans le but de quantifier l'effet des fractions sur les cellules, nous avons tout d'abord

utilisé une coloration des cellules au Bleu Evans (Fig. 32a). Ce test, réalisé sur une cellule de Malassez, devait nous permettre de réaliser des comptages en distinguant les cellules vivantes des cellules mortes et ainsi obtenir un ratio. Mais cette démarche s'est révélée très chronophage et a posé quelques problèmes, notamment une variation importante des comptages d'un échantillon à l'autre due à une hétérogénéité de la répartition des cellules dans une même suspension. De plus, les cellules embryogènes ont tendance à sédimenter très vite. Ce test de viabilité donne une tendance, mais trop d'erreurs expérimentales rendent les résultats non significatifs.

L'utilisation de la FDA (fluorescéine diacétate) permet également de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes (Fig. 32b). Ces observations donnent une indication sur l'activité métabolique générale d'une suspension cellulaire, mais un comptage précis n'a pas pu être réalisé pour les mêmes raisons que précédemment.

Les premières observations de cellules colorées au DAPI n'ont pas permis de différencier les cellules endommagées de celles en bon état et aucun différentiel n'a été observé.



**Figure 32** : Cellules colorées avec (a) Bleu Evans, (b) FDA (fluorescéine diacétate), (c) DAPI. Les cellules vivantes apparaissent blanches à bleu clair avec le Bleu Evans. L'intensité de la fluorescence verte traduit une hydrolyse de la FDA et donc une activité enzymatique de la cellule. Le DAPI se fixe sur l'ADN et révèle l'état des noyaux.

### 3.2.2.3. Aspect biochimique

Nous avons, dans un premier temps, mis au point une procédure d'extraction et de quantification de l'activité enzymatique intracellulaire des cellules de carotte dans nos conditions de travail en se basant sur les protocoles de Steward *et al.* (1999) et de Vitecek *et al.* (2007). Les premiers essais ont été marqués par plusieurs difficultés d'ordre technique. Tout d'abord nous travaillons sur de faibles quantités (1 mL de suspension cellulaire). Ceci ne nous a pas permis d'effectuer une extraction comme décrit dans la littérature. Nous avons donc adapté une méthode utilisant un broyage à l'aide de billes, de sable de Fontainebleau et d'azote liquide (cf. §2. Matériels et méthodes). L'extraction a également été optimisée en ajustant les volumes des différents tampons à nos conditions, c'est-à-dire obtenir un extrait suffisamment concentré mais permettant d'effectuer trois lectures de l'activité enzymatique et

trois lectures de la quantité de protéines.

Autre verrou technique auquel nous avons dû répondre, au vu du nombre d'échantillons et du volume de nos extraits, il n'a pas été possible de faire l'ensemble des mesures comme décrit dans la littérature, c'est-à-dire en utilisant des cuvettes et un fluorimètre classique. Pour parer à cela, nous avons développé une méthode utilisant un fluorimètre à plaque. De plus, cet appareil nous a permis d'effectuer des mesures tout au long de la réaction (mesures en cinétique) pour l'ensemble des échantillons, contrairement aux cuvettes où la lecture se fait en point final. Nous avons pu tirer un avantage de ce mode cinétique lors du calcul de la vitesse de réaction.

#### Établissement des courbes étalons

Les gammes étalons de fluorescéine et de BSA, permettent respectivement de calculer la concentration de fluorescéine formée lors de la réaction enzymatique et la quantité de protéines contenue dans nos échantillons (cf. Annexe 2).

#### Activité enzymatique spécifique

L'activité enzymatique spécifique a été calculée pour chaque échantillon (tableau de données non présenté). Cette activité spécifique nous a permis de calculer un effet de l'extrait fongique ou de la concentration de zinniol appliqué (Fig. 33).

Concernant le génotype K3, on observe un effet significatif par rapport à l'activité enzymatique du témoin lors du traitement des cellules avec les extraits aA et oA. Cet effet consiste en une augmentation de l'activité enzymatique des cellules traitées avec ces fractions. On peut également noter la tendance d'un effet stimulateur de bA et du zinniol à 500  $\mu\text{M}$  sur l'activité enzymatique, mais de façon non significative par rapport au témoin.

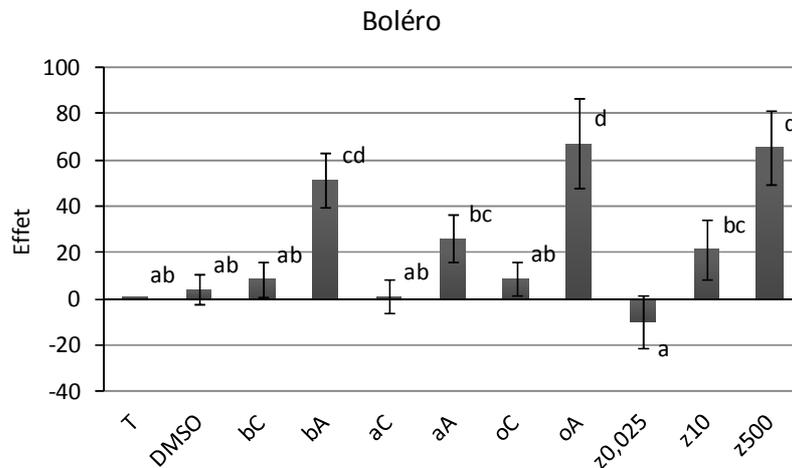
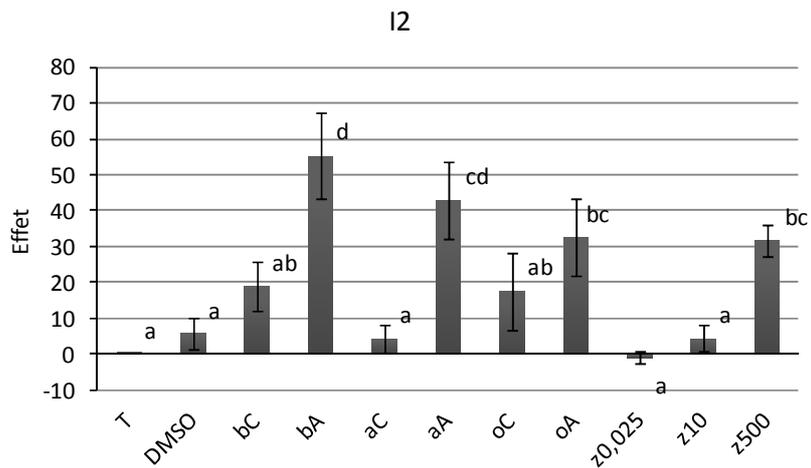
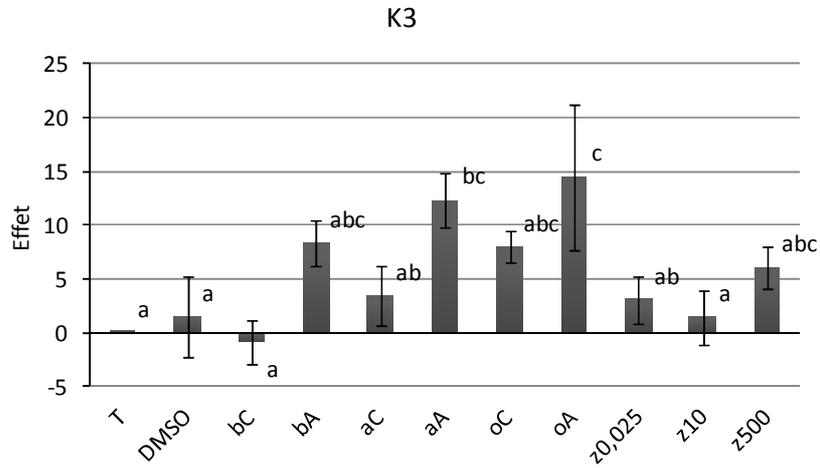
Avec le génotype I2 l'effet stimulateur est encore plus important (jusqu'à +55 % d'activité) avec les fractions bA, aA, oA et le zinniol à 500  $\mu\text{M}$ . La fraction aC, le zinniol à 0,025  $\mu\text{M}$ , le zinniol à 10  $\mu\text{M}$  et le DMSO ne se distinguent pas du témoin.

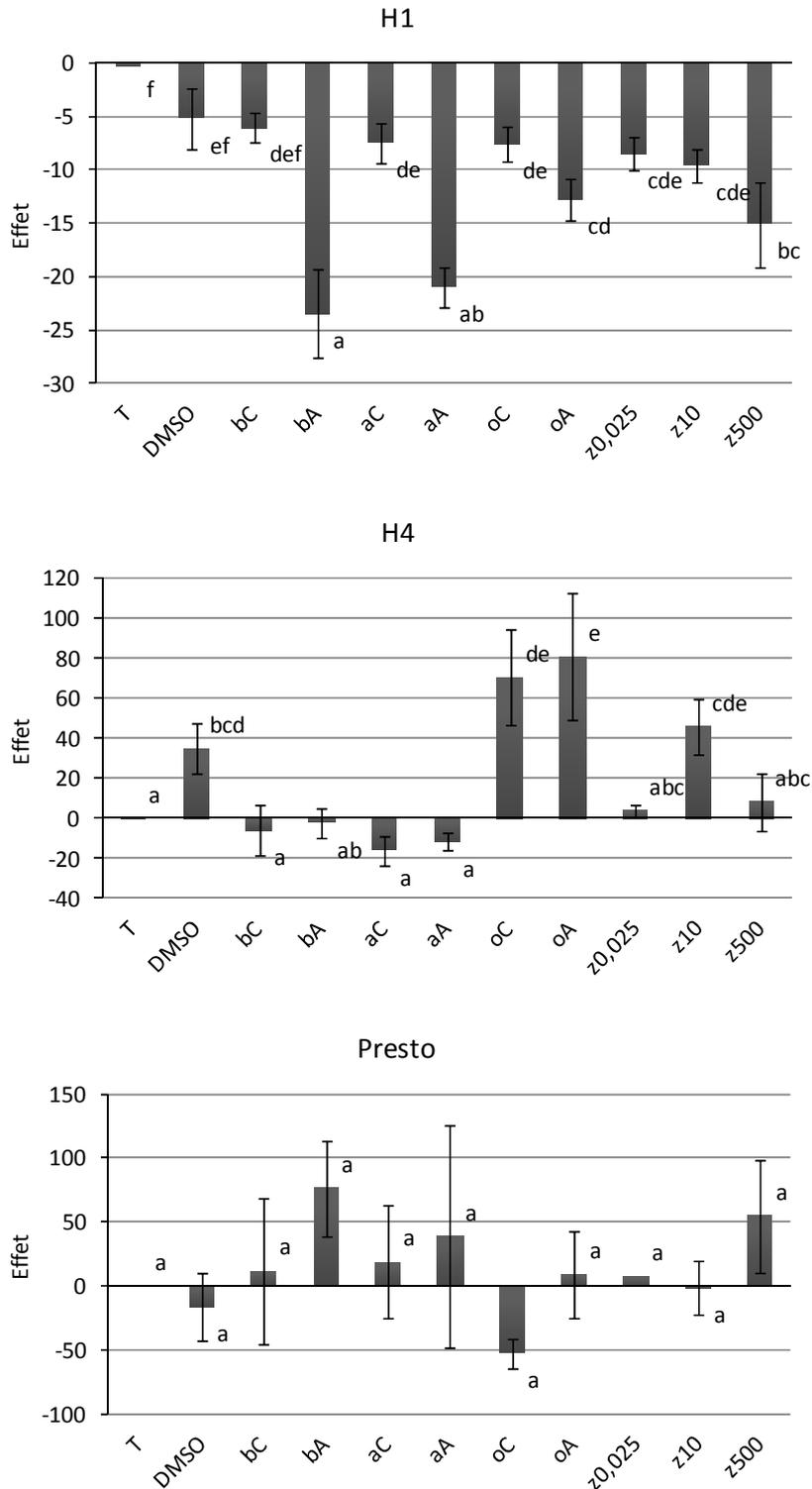
Cette stimulation de l'activité enzymatique par les fractions bA, oA et le zinniol à 500  $\mu\text{M}$  s'observe également de façon significative chez le génotype Boléro. De même, il n'y a pas d'effet des fractions bC, aC et oC, ni du DMSO par rapport au témoin.

En revanche, chez le génotype H1, la tendance est inverse, à savoir une diminution de l'activité enzymatique suite aux traitements. Cette diminution est significative avec les fractions bA, aA et oA, ainsi qu'avec les trois concentrations de zinniol. On observe également un effet significatif de aC et de oC par rapport au témoin, mais cet effet est non significatif si on le compare avec la fraction bC et le DMSO.

Concernant le génotype H4, il n'y a pas d'effet significatif des fractions bC, bA, aC et aA ainsi que du zinniol à 0,025  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$ . *A contrario*, les fractions oC et oA déclenchent une stimulation importante de l'activité, respectivement +70 % et +80 %. On peut également

noter un effet significatif du DMSO montrant une stimulation de l'activité enzymatique sur ce génotype. En ce qui concerne Presto, aucun traitement n'a d'effet significatif par rapport au témoin.



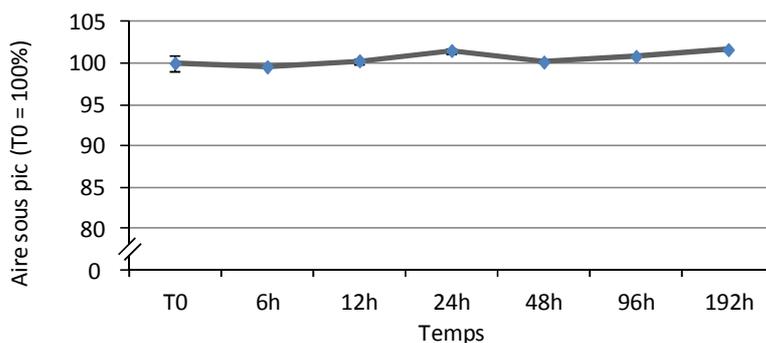


**Figure 33 :** Effet des extraits fongiques sur l'activité enzymatique spécifique des six génotypes, calculé par rapport aux témoins en base 0. Les barres d'erreur représentent les erreurs types. Les traitements possédant la même lettre ne sont pas significativement différents (comparaison multiple avec le test LSD). T : témoin ; DMSO : milieu Gamborg additionné de 0,1 % de DMSO ; bC : filtrat brut obtenu à partir du milieu jus de carotte non inoculé ; bA = filtrat brut d'Alternaria ; aC = fraction aqueuse du milieu jus de carotte non inoculé ; aA = fraction aqueuse de l'extrait d'Alternaria ; oC = fraction organique du milieu jus de carotte non inoculé ; oA = fraction organique de l'extrait d'Alternaria ; z0,025 : zinniol à 0,025  $\mu\text{M}$  ; z10 : zinniol à 10  $\mu\text{M}$  ; z500 : zinniol à 500  $\mu\text{M}$ .

### 3.3. Dosage du zinniol

#### 3.3.1. Stabilité du zinniol

En parallèle de la mise au point du test avec les suspensions cellulaires, nous avons étudié la stabilité chimique du zinniol. En effet, lors de la mise au point de la synthèse de ce dernier, les chercheurs du laboratoire SONAS, se sont rendus compte que dans certaines conditions (en présence de solvant acide notamment) le composé était rapidement dégradé. Le zinniol est synthétisé dans le chloroforme deutéré<sup>4</sup> ( $\text{CDCl}_3$ ). Ce solvant organique est connu pour dégager des traces de HCl et donc augmenter l'acidité du milieu (J.J. Helesbeux, com. pers.). Par ailleurs, le milieu de culture utilisé pour nos cellules possédant un pH de 5,8 pourrait contribuer à la dégradation du zinniol. Nous avons effectué un test de stabilité du zinniol en fonction du temps en incluant une quantité connue de zinniol ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) dans le milieu Gamborg : les résultats montrent que la teneur en zinniol ne varie pas de façon significative (Fig. 34). Le zinniol est donc stable sur la durée considérée dans nos conditions de culture.



**Figure 34 :** Mesure de la stabilité du zinniol dans le milieu de culture Gamborg (pH 5,8) en fonction du temps par analyse CLHP. L'aire sous le pic correspondant au zinniol a été calculée.

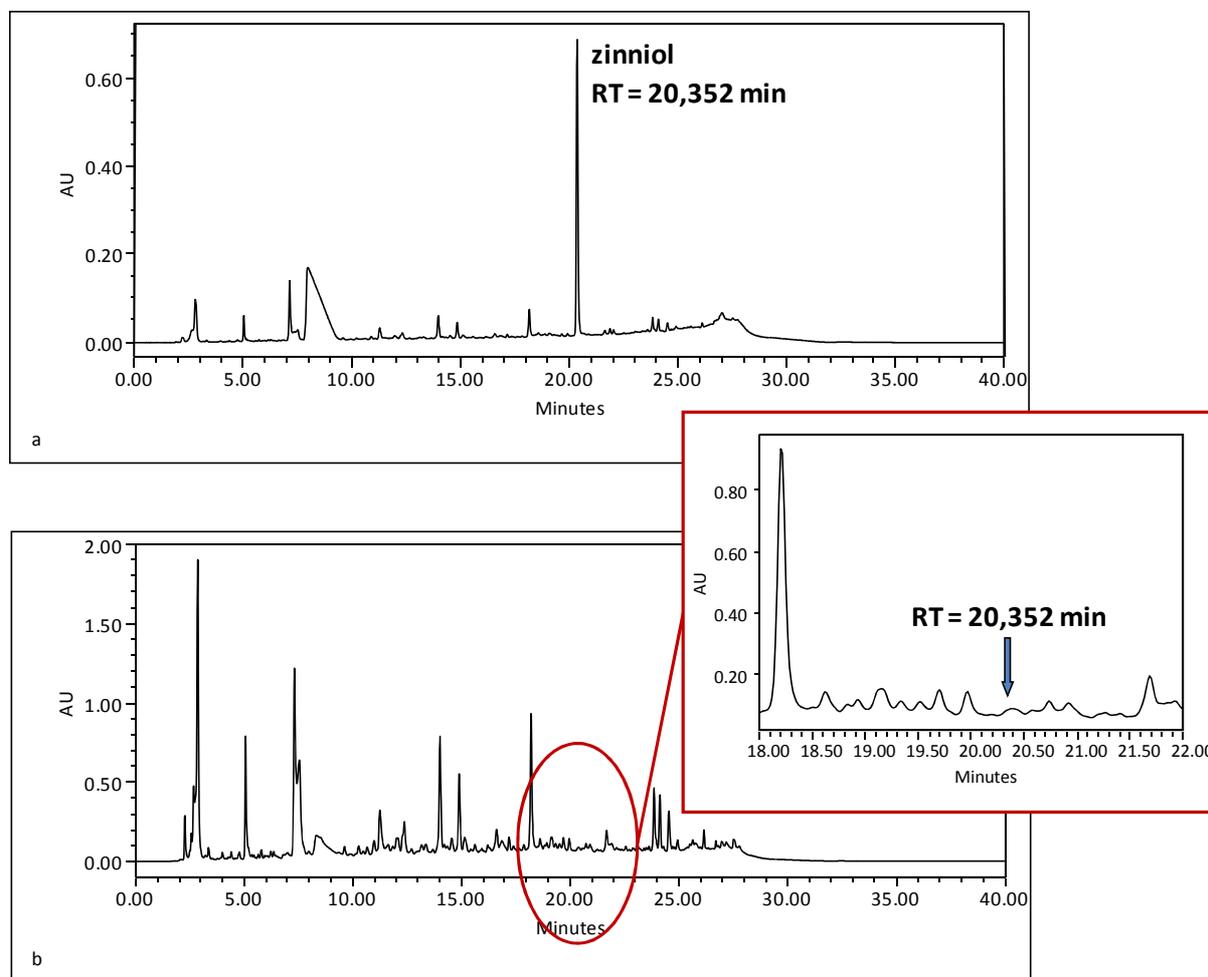
Les chromatogrammes obtenus par analyse des différents prélèvements faits au cours de cette étude de stabilité présentent un profil identique. Les résultats montrent une certaine homogénéité. Cela traduit une stabilité du zinniol satisfaisante pour la réalisation des traitements en CIV.

#### 3.3.2. Dosage du zinniol dans les extraits fongiques

Un dosage du zinniol a été effectué sur un échantillon de fraction organique (Fig. 35). Dans nos conditions d'analyse CLHP, il n'a pas été possible de détecter ce composé dans nos extraits. Le seuil de détection a été déterminé à  $0.025 \mu\text{M}$ . Nos extraits ne contiennent pas de zinniol au-delà du seuil de détection. Par ailleurs, suite à une collaboration entre le SONAS et

<sup>4</sup> Composé chimique dans lequel l'atome d'hydrogène H est remplacé par un atome de deutérium D, un isotope stable de l'hydrogène, utilisé en spectroscopie RMN des molécules organiques.

Luis Manuel Peña-Rodríguez, chercheur au Centro de Investigación Científica de Yucatán (Mexique), des extraits ont été produits à partir de la souche P2 d'*Alternaria dauci* mais dans des conditions de culture différentes de celles que nous avons utilisées (culture sans agitation notamment). Ces extraits comportent une quantité aisément détectable de zinniol (J.J. Helesbeux, com. pers.).



**Figure 35 :** Chromatogramme d'un extrait organique oA additionné de zinniol pur (a), et du même extrait seul (b). Au temps de rétention attendu (RT = 20,352 min), il n'y a pas de zinniol détecté dans l'échantillon oA.

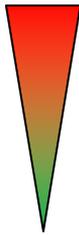
## 4. Discussion

Ce chapitre avait pour but de vérifier l'hypothèse d'un lien entre la résistance de plantes entières face au champignon et la résistance des cellules végétales face à des composés toxiques produits par le champignon. La première partie des résultats, à l'échelle de la plante entière, indiquent que les six génotypes utilisés dans cette étude possèdent un différentiel de résistance face au champignon. En effet, ces six génotypes peuvent être distingués de façon significative en quatre classes de résistance lorsque l'on s'intéresse au nombre de symptômes et en trois classes si l'on regarde la biomasse fongique. Si l'on compare ces deux méthodes, on s'aperçoit que malgré la bonne corrélation qui existe entre elles (Fig. 28), le classement de certains génotypes est différent en fonction de ces deux méthodes. Ceci est notamment vrai pour les génotypes sensibles H1 et Presto où, du point de vue du nombre de symptômes, H1 est le génotype le plus sensible, alors que du point de vue de la biomasse fongique, Presto est plus atteint. Le même type d'observation peut être fait avec les génotypes partiellement résistants I2 et H4, bien que les différences ne soient pas significatives entre génotypes : I2 semble présenter moins de symptômes que H4, en revanche I2 est supérieur à H4 du point de vue de la biomasse fongique (Fig. 28). Cette observation est à rapprocher de ce que nous avons mis en évidence précédemment avec les variétés Boléro et Texto (Boedo *et al.*, 2010), à savoir qu'il existe des mécanismes de résistance partielle différents que l'on peut mettre en évidence selon la méthode d'évaluation utilisée, en l'occurrence les notations visuelles de la maladie ou la quantification de la biomasse du champignon.

Dans une seconde approche, nous avons réalisé des observations macroscopiques de développement d'embryons somatiques dans des suspensions cellulaires mises en contact avec des extraits de culture fongique ou en présence de différentes concentrations de zinniol. Nous pouvons établir un classement des génotypes en fonction de leur sensibilité aux extraits fongiques ou au zinniol (Tab. VII). Ce classement n'est pas obtenu à partir d'un modèle statistique, mais à partir de la synthèse des résultats présentés dans le Tableau VI. Avec le filtrat brut (bA), le génotype H1 est le plus sensible, viennent ensuite Presto, H4, Boléro, I2 et K3. Boléro, I2 et K3 sont les seuls génotypes capables de former des embryons somatiques en présence de l'extrait fongique. Lors du traitement avec la fraction aqueuse (aA), il n'a pas été

possible de distinguer les génotypes selon leur sensibilité. Signalons tout de même le fait que la division cellulaire a été légèrement stimulée chez le génotype K3 suite à l'application de cet extrait. L'application de la fraction organique (oA) permet d'établir le même classement des génotypes que celui obtenu après l'application du filtrat brut. H1, Presto et H4 sont les génotypes les plus sensibles à cet extrait fongique, Boléro a plutôt un comportement intermédiaire, alors que K3 et I2 sont les plus résistants. Concernant le zinniol, les deux concentrations les plus faibles (0,025  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$ ) ne permettent pas de distinguer les génotypes. En revanche, avec la concentration de 500  $\mu\text{M}$ , I2 et K3 sont tous deux capables de former quelques embryons, alors que les quatre autres génotypes en sont incapables et ne se différencient pas entre eux sur ce point.

**Tableau VII :** Classement des génotypes en fonction de leur sensibilité aux extraits fongiques et au zinniol. bA = filtrat brut d'*Alternaria* ; aA = fraction aqueuse de l'extrait d'*Alternaria* ; oA = fraction organique de l'extrait d'*Alternaria*. Les accolades regroupent les génotypes dont le comportement n'est pas différent.

Sensibilité	bA	aA	oA	Zinniol			
				0,025 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	
	H1	H1 Presto H4 Boléro	H1	H1 Presto H4 Boléro	H1 Presto H4 Boléro	H1 Presto H4 Boléro	
	Presto		Presto				Presto
	H4		H4				H4
	Boléro		Boléro				Boléro
	I2	I2 K3	I2	I2 K3	I2 K3	I2 K3	
	K3		K3				K3

En conclusion, nous avons mis en évidence l'incapacité de certains génotypes à former des embryons somatiques en présence d'extrait fongique, il existe donc un fort effet de ces extraits sur la physiologie des cellules. La production d'embryons somatiques chez les génotypes de carotte en présence de fractions toxiques du champignon pourrait être utilisée comme marqueur de la résistance à *A. dauci*, en utilisant le filtrat brut d'*A. dauci* ou la fraction organique. Nous n'avons pas observé d'effet du zinniol à la concentration physiologique de 10  $\mu\text{M}$  (Qui *et al.*, 2010) ou à une concentration 400 fois inférieure (0,025  $\mu\text{M}$ ). Par ailleurs, dans des extraits organiques produits dans des conditions de culture non agitées du champignon (cultures en bioréacteur), une concentration en zinniol de 10  $\mu\text{M}$  a été détectée (L. Peña-Rodrigues, com. pers.). En revanche, le zinniol n'a pas été détecté dans nos extraits fongiques, produits à partir de cultures agitées du champignon. Les fractions brutes et organiques ayant un effet significatif sur le développement des cultures cellulaires (division, conversion en embryons) dans nos expériences, ce n'est donc pas le zinniol qui est responsable du phénomène que l'on observe. D'après nos résultats, seule la très forte concentration de zinniol utilisée (500  $\mu\text{M}$ ) a permis de montrer un différentiel entre les génotypes. Cette concentration de 500  $\mu\text{M}$  en zinniol a été utilisée par Qui *et al.* (2010) et a permis de montrer un effet dépressif sur des cultures cellulaires de la rose d'Inde (*Tagetes*

*erecta*).

Les données sur l'embryogénèse somatique sont basées sur des observations visuelles mais ne permettent pas une approche quantitative des phénomènes de résistance partielle. Dans le but de mettre au point un test quantitatif, les premières observations de cellules colorées au DAPI n'ont pas permis de différencier les cellules endommagées de celles en bon état. Nos résultats diffèrent des travaux de Qui *et al.* (2010) : ceux-ci montrent que les cellules de *Tagetes erecta* endommagées suite à un traitement de 48h avec la phase organique issue d'une culture d'*Alternaria tagetica*, présentent une migration des noyaux vers la périphérie, ainsi qu'une condensation de la chromatine. Une autre méthode permettant une quantification de l'effet toxique des fractions brutes et organiques a donc été mise au point.

Nous avons développé un test de dosage de l'activité enzymatique cellulaire. Le test de viabilité cellulaire basé sur l'utilisation de la fluorescéine diacétate (FDA) est utilisé pour évaluer l'effet toxique du cuivre chez des microalgues marines (Blanchette, 2006) ou pour évaluer l'activité de microorganismes dans le sol (Green *et al.*, 2006). Ce test de viabilité a également été utilisé sur des suspensions cellulaires de plantes supérieures (Steward *et al.*, 1999 ; Vitecek *et al.*, 2007). Il nous semblait donc adapté à notre problématique. Le principe de cette méthode est que l'activité enzymatique globale d'une culture est corrélée à l'état physiologique et à la viabilité des cellules de cette culture. L'utilisation de la FDA permet de détecter l'activité des estérases intracellulaires. À partir des travaux de Vitecek *et al.* (2007), nous avons optimisé ce protocole et nous l'avons adapté à la faible quantité de matériel végétal de départ et au grand nombre de manipulations à effectuer : les travaux ont été menés sur six géotypes ayant un niveau de résistance au champignon différent. Ce test de viabilité est relativement lourd à mettre en œuvre, mais permet une comparaison quantitative des échantillons : ainsi le test FDA a-t-il permis de différencier nettement les géotypes partiellement résistants K3, I2 et Boléro du géotype sensible H1. Le géotype H4 présente un profil de réponse intermédiaire et les données obtenues avec Presto ne sont pas exploitables en l'état. En réponse à l'application de la fraction brute d'*A. dauci* (bA), il est possible de distinguer les géotypes I2 et K3 par une activité métabolique plus importante chez I2 (Fig. 33). Cette observation va dans le sens de l'existence d'une diversité des modes de résistance partielle chez les géotypes étudiés. La résistance de la carotte à *A. dauci* est au moins due en partie à une résistance aux toxines du champignon. Le géotype K3 est cependant le plus résistant des géotypes sur la base des notations visuelles sur plante entière (Fig. 26). D'autres mécanismes que ceux impliqués dans la résistance aux toxines semblent donc exister. Des mécanismes impliquant les voies de défense liées aux régulateurs hormonaux pourraient intervenir, et en particulier, dans le cas d'un champignon nécrotrophe, celle liée aux gènes de la voie de l'acide jasmonique. Nous allons étudier cette voie dans le chapitre suivant.



## **Chapitre IV :**

### **Polymorphisme et niveau d'expression de gènes liés à la voie de l'acide jasmonique**

## 1. Introduction

Pour se défendre des infections d'entités pathogènes, les plantes disposent d'une grande variété de mécanismes de défense. Certains sont constitutifs, d'autres sont induits suite à des stress biotiques ou abiotiques. Ces mécanismes de défense se mettent en place suite à la perception par la plante d'une attaque exogène. Celle-ci résulte en une cascade de signalisations intracellulaires aboutissant à l'induction des effecteurs de la défense. Différentes voies de signalisation sont impliquées selon la nature de l'attaque et les caractéristiques trophiques du parasite (Glazebrook, 2005).

Il existe chez les plantes trois voies principales de défense : la voie de l'acide salicylique, la voie de l'acide jasmonique et la voie de l'éthylène. Elles correspondent à des cascades d'induction qui n'activent pas les mêmes gènes de défense (Spoel *et al.*, 2003) et peuvent agir soit en synergie, soit de façon antagoniste. Comme nous l'avons décrit dans la synthèse bibliographique, de façon simplifiée, la voie de l'acide salicylique intervient dans la réponse liée à l'attaque par un agent pathogène biotrophe en déclenchant des réponses hypersensibles (HR), ainsi que la propagation d'un signal de défense dans toute la plante : la résistance systémique acquise (SAR). Les voies de l'éthylène et du jasmonate sont, quant à elles, déclenchées dans le cadre de réponses à l'attaque par un agent pathogène nécrotrophe ou à une blessure. L'éthylène intervient également dans la réponse à des stress d'origine abiotique.

Compte-tenu du caractère polygénique de la résistance de la carotte face à *A. dauci*, notre hypothèse de départ est que la variation de sensibilité observée entre différentes variétés n'est pas due à la présence/absence de gène(s) majeur(s) de résistance. Cette variation du degré de sensibilité/résistance serait plutôt le résultat phénotypique d'un polymorphisme de séquences de certains gènes de défense ou bien d'une variation du niveau d'expression de ces gènes entre variétés sensibles et résistantes. Le pathogène étudié étant nécrotrophe, le travail de recherche s'est principalement orienté vers la voie de l'acide jasmonique et des gènes de défense qu'elle est susceptible d'induire chez la carotte en réaction à *A. dauci*. Le but est d'améliorer les connaissances concernant les gènes effecteurs de la résistance aux pathogènes nécrotrophes et plus précisément à ceux induits chez la carotte en réponse à l'attaque par *A. dauci*.

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur les points suivants : d'après la bibliographie, quels sont les gènes effecteurs qui pourraient être impliqués dans la résistance partielle à *A. dauci* ? Comment obtenir les séquences de ces gènes chez la carotte ? Existe-t-il des différences de séquences dans ces gènes entre les génotypes sensibles et partiellement résistants, et si oui ce polymorphisme de séquences peut-il expliquer, au moins en partie, la résistance à *A. dauci* ? Quels sont les profils d'expression de ces gènes en situation d'infection par le champignon ?

Afin de répondre à ces questions, la démarche expérimentale s'est appuyée sur une stratégie gène candidat : la littérature a permis d'identifier des gènes induits lors d'une attaque pathogène chez plusieurs espèces végétales. La conception d'amorces dégénérées à partir de l'alignement de séquences homologues a été la base du travail de clonage et de séquençage des gènes candidats. Le polymorphisme des séquences obtenues a été analysé chez les six génotypes de carotte correspondant à différents degrés de sensibilité/résistance à *A. dauci*. Enfin le niveau d'expression de quelques gènes candidats sélectionnés a été mesuré chez les différents génotypes, suite à une attaque due au champignon.

Ce chapitre n'est que préliminaire, l'acquisition de données supplémentaires est nécessaire afin de construire un article relatif à cette partie. En revanche un 'Extended abstract' a été publié suite à la présentation de notre démarche lors d'un colloque (Lecomte *et al.*, 2011 ; Annexe 10).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel biologique

Pour ce chapitre, nous avons utilisé le même matériel biologique que précédemment (cf. Chapitre III), à savoir les génotypes de carotte K3, I2, H4, H1, Presto et Boléro et la souche P2 (FRA017) d'*A. dauci*.

### 2.2. Extraction des acides nucléiques

#### 2.2.1. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN des six génotypes de carotte utilisés ont été réalisées à partir de plantes cultivées en serre, issues de la même culture que celle ayant servi à l'obtention des génotypes en culture *in vitro* (cf. Chapitre III § 2.4.1.). Les feuilles les plus jeunes de ces plantes ont été récoltées, puis 5 g de limbes ont été broyés avec de l'azote liquide au mortier puis stockés dans un tube de 50 mL à -80 °C.

Le protocole d'extraction des ADN est inspiré des travaux de Hoisington *et al.* (1994). Aux 5 g de feuilles réduites en poudre, ont été ajoutés 27 mL de tampon d'extraction (Tris HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,7 M, EDTA 50 mM pH 8, CTAB 10 g.L<sup>-1</sup>, sulfite de sodium 2,5 g.L<sup>-1</sup>). Après 90 min d'incubation à 65 °C au bain-marie avec agitation, 13 mL de mélange chloroforme-alcool isoamylique (24:1) ont été ajoutés. Une centrifugation à 1 500 g durant 10 min à température ambiante a été effectuée et le surnageant a été récupéré. L'ajout de chloroforme-alcool isoamylique (24:1) et la centrifugation ont été réalisés une seconde fois de manière identique. Le surnageant a été récupéré puis traité avec de la RNase T1 (2,5 U) pendant 30 min à 37 °C.

L'ADN a été précipité par ajout de 18 mL (0,6 vol.) d'isopropanol. Une pelote d'ADN a

été formée puis récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur étirée en forme de crochet. La pelote a ensuite été plongée pendant 20 min dans un tube contenant 1 mL de solution de lavage 1 (éthanol 80%, acétate de sodium 0,2 M) puis quelques secondes dans un second tube contenant 1 mL de solution de lavage 2 (éthanol 80%, acétate d'ammonium 10 mM). Finalement, la pelote d'ADN a été séchée délicatement à l'aide d'un papier absorbant (KimWipes, Kimberly-Clark) et reprise dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon TE (1X, pH 8). La concentration des extraits d'ADN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000, Nyxor Biotech) puis ajustée à 100  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  avec de l'eau ultra-pure stérile. L'ensemble des échantillons a été conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2. Extraction d'ARN**

Pour chacun des six génotypes étudiés et pour une modalité (plante inoculée ou non, prélèvement à différents temps après inoculation), la feuille F3 d'une plante, constituant un échantillon, a été prélevée en serre, placée dans un tube de 15 mL et plongée immédiatement dans de l'azote liquide. Chaque feuille a ensuite été broyée grossièrement à l'aide d'une tige en verre et la poudre ainsi obtenue répartie dans deux tubes Eppendorf de 2 mL ( $\approx 100$  mg de poudre par tube) stockés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pour la suite, un seul des deux tubes a été utilisé.

Les extractions ont été réalisées en utilisant le kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel). Les échantillons, auxquels une pointe de spatule de polyvinylpyrrolidone (PVP40, Sigma-Aldrich) a été ajoutée, ont été broyés avec de l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille. La poudre ainsi obtenue a été homogénéisée avec le tampon RA1 additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol selon les indications fournies par le fabricant. Après filtration au travers du filtre fourni dans le kit, de l'éthanol 70 % a été ajouté à l'extrait puis le tout a été chargé sur la colonne également fournie dans le kit d'extraction. Une centrifugation a permis d'éliminer le surnageant, puis les acides nucléiques retenus sur la colonne ont été traités avec de la DNase. Après plusieurs lavages, la colonne a été séchée par centrifugation puis les ARN ont finalement été élués en utilisant 40  $\mu\text{L}$  d'eau RNase-free ; l'éluat a été déposé une deuxième fois sur la colonne. Les ARN ont ensuite été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop® ND-1000, Nyxor Biotech) puis les concentrations ont été ajustées à 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  avec de l'eau RNase-free. L'ensemble des échantillons a été conservé à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **2.3. Mise en évidence de gènes candidats**

### **2.3.1. Recherche bibliographique des gènes candidats et alignements**

Les gènes candidats ont été identifiés à partir de différentes publications scientifiques traitant de la résistance face aux agents pathogènes nécrotrophes et plus particulièrement de la

voie de biosynthèse de l'acide jasmonique, de la voie de signalisation liées à l'acide jasmonique et des gènes de défense associés (Tab. VIII). La séquence de ces gènes a été recherchée dans les bases de données nucléotidiques.

Toutes les séquences homologues disponibles dans les bases de données ont également été recherchées. Ainsi, pour chaque gène candidat, des alignements de séquences protéiques provenant de différentes espèces végétales dont *A. thaliana* ou d'espèces cultivées comme le riz, le peuplier, le soja, le tournesol ou le tabac, ont été réalisés à l'aide du logiciel d'alignements multiples ClustalW. Dans ces séquences, des zones conservées, c'est-à-dire présentant de fortes homologues de séquence protéique entre les différentes espèces ont été identifiées.

**Tableau VIII :** Présentation des gènes candidats et de leur fonction. SA : acide salicylique ; JA : acide jasmonique.

Nom du gène candidat	Fonction de la protéine	Références bibliographiques
<b>Voie de défense liée au SA</b>		
<b>PR-1</b>	Inconnue	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 2008 ; Thomma <i>et al.</i> , 2001
<b>Voie de défense liée à l'éthylène</b>		
<b>ERF 2</b> Facteur de réponse à l'éthylène 2	Facteur de transcription	Brown <i>et al.</i> , 2003 ; Fujimoto <i>et al.</i> , 2000 ; Yamamoto <i>et al.</i> , 1999
<b>Voie de défense liée au JA</b>		
<b>CHI-B</b> Chitinase B	Chitinase	Samac <i>et al.</i> , 1990
<b>PR-4, HEL</b> Protéine Hevein Like	Chitinase - Enzyme antifongique	Ferreira <i>et al.</i> , 2007 ; Reymond et Farmer, 1998
<b>PR-5</b> Protéine Thaumatin Like	Osmotine, Protéine antifongique	Ferreira <i>et al.</i> , 2007 ; Liu <i>et al.</i> , 2010
<b>PR-12, PDF1.2</b> Défensine	Protéine antifongique	Brown <i>et al.</i> , 2003 ; Penninckx <i>et al.</i> , 1998 ; Zarei <i>et al.</i> , 2011
<b>PR-13, Thi2.1</b> Thionine	Perturbation de la perméabilité membranaire	Epple <i>et al.</i> , 1995
<b>Voie de biosynthèse du JA</b>		
<b>LOX 2</b> Lipoxygénase membranaire	Oxygénation de l'acide linoléique	Bell <i>et al.</i> , 1995 ; Jensen <i>et al.</i> , 2002
<b>AOS</b> Allene oxide synthase	Déshydratation des hydroperoxydes	Seo <i>et al.</i> , 2001a
<b>AOC</b> Allene oxide cyclase	Isomérisation des époxydes	Sasaki <i>et al.</i> , 2001 ; Stenzel <i>et al.</i> , 2003 ; Ziegler <i>et al.</i> , 2000
<b>JMT</b> Méthyl Jasmonate Transférase	Méthylation du JA	Seo <i>et al.</i> , 2001a ; Staswick et Tiriyaki, 2004

Voie de transduction du signal JA		
<b>COI1</b> Protéine F-box, coronatine-insensitive 1	Dégradation du répresseur JAZ 3	Feys <i>et al.</i> , 1994 ; Li <i>et al.</i> , 2004b ; Xie <i>et al.</i> , 1998
<b>MPK 4</b> MAP Kinase 4	Régulateur positif de la réponse au JA	Brodersen <i>et al.</i> , 2006 ; Innes, 2001 ; Lorenzo et Solano, 2005
<b>JAR1</b> JA-amino synthase	Synthèse du jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile)	Staswick <i>et al.</i> , 1998
<b>JAZ 3</b> Jasmonate ZIM-domain	Répresseur de facteur de transcription	Browse, 2009 ; Santner et Estelle, 2007
<b>MYC2</b>	Facteur de transcription	Chini <i>et al.</i> , 2007 ; Lorenzo <i>et al.</i> , 2004 ; Niu <i>et al.</i> , 2011
<b>NINJA</b> Novel Interactor of JAZ	Co-répresseur lié à JAZ 3	Pauwels <i>et al.</i> , 2010
Autres gènes		
<b>PAL</b> Phénylalanine ammonia lyase	Voie de biosynthèse de phytoalexines	Zhu <i>et al.</i> , 1995
<b>GLP</b> Protéine Germin-Like	Activité superoxide dismutase	Zimmermann <i>et al.</i> , 2006

### 2.3.2. Conception des amorces

Des amorces oligonucléotidiques ont été conçues à partir des zones conservées identifiées. Étant donné la redondance du code génétique (un acide aminé est codé par plusieurs triplets de nucléotides), les amorces conçues sont dégénérées c'est-à-dire que pour une séquence protéique donnée, il existe plusieurs séquences nucléotidiques possibles (cf. Annexe 3). Les zones conservées contenant des acides aminés à forte redondance comme la sérine (S), la leucine (L) et l'arginine (R) ont été évitées tant que possible.

Différents critères ont été pris en compte dans la conception de ces amorces. Tout d'abord nous avons sélectionné des régions conservées espacées d'au moins 150 paires de bases (50 acides aminés), mais pas plus de 1,5 kb. De plus, l'hybridation des amorces devait être aussi spécifique que possible ; nous avons donc joué sur la longueur des amorces (supérieure ou égale à 20 pb) et leurs taux de dégénérescence (taux inférieur à 100) tout en veillant à ce que les températures d'hybridation des amorces reverse et forward soient du même ordre de grandeur ( $55\text{ °C} < T_m < 65\text{ °C}$ ).

Afin de diminuer la dégénérescence, qui correspond au nombre des différentes séquences possibles, nous avons utilisé, dans la séquence des amorces, des bases inosine capables de remplacer à la fois les bases A, T, G et C. Lorsque la dégénérescence restait malgré tout trop élevée, plusieurs amorces ont été conçues au niveau d'un même site. Les séquences des amorces dégénérées utilisées sont présentées dans l'Annexe 4.

### **2.3.3. Amplification par PCR des gènes candidats**

Pour l'amplification des gènes candidats par PCR via l'utilisation d'amorces dégénérées, nous avons utilisé comme matrice l'extrait d'ADNg du génotype Presto. Les réactions PCR ont été réalisées avec 100 ng d'ADN dans 25 µL de milieu réactionnel comprenant 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, le tampon DNA polymérase (Uptitherm, Interchim) à la concentration 1X, 0,25 mM de dNTP, 0,15 U de Taq polymérase (Uptitherm, Interchim), 16 µM d'amorce forward, 16 µM d'amorce reverse et de l'eau milli-Q q.s.p. 25 µL.

L'utilisation d'oligonucléotides dégénérés nécessite souvent une phase d'optimisation des conditions de PCR. Dans un premier temps, des PCR standards ont été réalisées avec le programme suivant : dénaturation à 94 °C pendant 2 min, puis 30 cycles comprenant chacun la séquence suivante : 30 s de dénaturation à 94 °C, 30 s d'hybridation à 55 °C, 1 min d'élongation à 72 °C, une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 5 min, et enfin 10 min à 4°C. Pour certains gènes candidats, lorsque qu'un produit d'amplification spécifique n'a pu être obtenu avec la méthode précédente, différentes quantités d'ADN et d'amorces ont été testées avec le même programme d'amplification.

Dans certains cas, d'autres conditions d'amplification ont été utilisées de façon à jouer sur les spécificités d'hybridation. Ainsi des PCR ont été réalisées avec un gradient de température où les couples d'amorces sont soumis à différentes températures d'hybridation variant de 50 à 58 °C. Pour ces amplifications avec gradient de température, le programme PCR utilisé a été le suivant : dénaturation à 94 °C pendant 2 min, puis 30 cycles comprenant chacun la séquence suivante : 30 s à 94 °C, hybridation entre 50 et 58 °C pendant 30 s, élongation 2 min à 72°C, élongation finale à 72 °C pendant 5 min, puis 10 min à 4 °C. Une autre technique a aussi été utilisée, il s'agit de la PCR Touchdown au cours de laquelle la température d'hybridation des premiers cycles est plus élevée pour favoriser la spécificité des amplifications. Pour ces PCR Touchdown, le programme PCR utilisé a été le suivant : dénaturation à 94 °C pendant 2 min, 20 cycles de 30 s à 94°C, hybridation à 65°C pendant 30 s pour les 5 premiers cycles puis diminution d'un degré à chaque cycle suivant, 2 min à 72 °C, puis 30 cycles de 30 s à 94 °C, 30 s à 55 °C, 2 min à 72 °C, élongation finale à 72 °C pendant 5 min, puis 10 min à 4 °C. Toutes les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur C1000 Thermal Cycler (BIORAD).

### **2.3.4. Révélation des fragments amplifiés**

Suite aux réactions PCR, 5 µL des produits de réaction ont été additionnés de 3 µL de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,02 %, xylène cyanol 0,02 %, glycérol 3 %, TBE 0,5 X) et déposés sur un gel d'agarose à 2 % dans du tampon TBE 0,5 X pH 8,3. Un marqueur de taille (100 bp DNA Ladder, Invitrogen) a été utilisé. La migration a ensuite eu lieu à 100 V pendant 35 min, puis le gel a été immergé dans un bain de BET (bromure d'éthidium, 0,01 %) pendant 15 min et révélé par exposition aux radiations UV.

### **2.3.5. Clonage et séquençage des produits d'amplification**

#### **2.3.5.1. Ligation**

Les fragments nucléotidiques amplifiés ont été insérés dans un vecteur pour être clonés. Les ligations ont été effectuées grâce au kit pGEM®-T easy (Promega), et conformément aux instructions fournies par le fabricant. Dans un volume final de 10 µL, 3 µL de produit PCR ont été mis en présence de 50 ng de plasmide pGEM®-T easy, 3 unités de T4 DNA ligase et de 5 µL de tampon 2X. Le mélange réactionnel a été incubé toute une nuit à 4°C.

#### **2.3.5.2. Désalage du milieu réactionnel**

Un désalage des produits de ligation a été effectué à l'aide de tubes microcon (Millipore). Le mélange réactionnel a été dilué avec de l'eau milli-Q (q.s.p. 400 µL), puis chargé sur la colonne et centrifugé à 1 000 g pendant 15 min. L'ADN a ensuite été élué en ajoutant 20 µL d'eau à la colonne, après avoir retournée cette dernière et l'avoir transférée dans un nouveau tube. Le tout a finalement été centrifugé à 1 000 g pendant 2 min.

#### **2.3.5.3. Transformation de bactéries compétentes**

Dans une cuve à électroporation posée sur de la glace, 20 µL de bactéries compétentes *E. coli* DH10B électrocompétentes (Invitrogen) ont été mises en présence de 5 µL de la réaction de ligation désalée. Le mélange a été électroporé à 1 800 V puis immédiatement repris dans 800 µL de milieu SOC (2 % p/v de Bacto®-tryptone, 0,5% p/v Bacto®-yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Mg<sup>2+</sup>, 20 mM glucose). Les bactéries ont été transférées dans un tube de 2 mL et mises à incuber pendant 1 h à 37 °C avec agitation.

Sur deux boîtes de Pétri contenant un milieu LB agar (10 g.L<sup>-1</sup> Bacto®-tryptone, 5 g.L<sup>-1</sup> Bacto®-yeast extract, 5 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 15 g.L<sup>-1</sup> agar, pH 7.0), additionné de 100 mg.L<sup>-1</sup> d'ampicilline, de 0,5 mM d'IPTG et de 80 mg.L<sup>-1</sup> de X-Gal, 100 µL de bactéries ont été étalés sur chacune des boîtes qui ont été mises en culture une nuit à 37 °C.

Des colonies blanches ont été prélevées et testées par PCR avec les amorces PUC1 (GTCACGACGTTGTAAAAC) et PUC2 (AGCTATGACCATGATTAC) spécifiques du vecteur pGEM®-Teasy et encadrant l'insert. Les produits d'amplification obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % (TBE 0,5X, 100 V, 35 min).

#### **2.3.5.4. Séquençage**

Après vérification de la longueur du fragment inséré, 20 µL de produits PCR obtenus à partir des ADN clonés ont été envoyés à séquencer auprès de la société GATC Biotech. La lecture de la séquence a été réalisée dans les deux sens via l'utilisation des amorces T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) et SP6 (ATTTAGGTGACACTATAGAA) présentes de part et d'autre de l'insert dans le vecteur pGEM®-Teasy.

#### **2.3.5.5. Analyse des séquences obtenues**

Les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel d'analyse de séquences

Geneious Pro 5.3.6 (Biomatters). Les motifs nucléotidiques correspondant à la séquence du vecteur encadrant le fragment cloné, ont été recherchés et éliminés. Pour chaque échantillon séquencé, les deux lectures ont été alignées afin de former un contig et d'obtenir une séquence consensus. Les séquences consensus obtenues ont ensuite été traduites en séquences protéiques en tenant compte des différentes possibilités de positionnement du cadre de lecture pour la traduction. Chaque séquence protéique a été alors alignée avec les séquences protéiques initiales ayant servi à l'identification des zones conservées afin de vérifier si le fragment amplifié correspondait bien à l'homologue du gène candidat recherché. Pour chaque gène candidat, plusieurs clones ont été séquencés, les séquences nucléotidiques de ces clones ont ensuite été comparées entre elles.

### 2.3.6. Séquençage des gènes candidats chez les six génotypes

Le travail présenté ci-dessus a été réalisé sur un échantillon d'ADN de carotte appartenant au génotype Presto, le but étant de mettre en évidence la présence de ces gènes candidats chez l'espèce étudiée. À partir des séquences obtenues avec l'utilisation d'amorces dégénérées, de nouvelles amorces, cette fois-ci spécifiques de la séquence de la carotte ont été conçues en utilisant le logiciel Primer3Plus (Primer3Plus [Internet]) (Tab. IX).

**Tableau IX :** Amorces conçues à partir des fragments clonés spécifiques de l'espèce carotte. Les lettres a ou b dans le nom des gènes cibles désignent deux séquences différentes obtenues suite au clonage. Légendes : *RBxxF* : amorce forward ; *RBxxR* : amorce reverse.

Nom	Gène cible	Tm (°C)	Longueur (pb)	Séquence 5'-3'
RB88F	COI1-a	59.3	24	AGTACAGATGGGTTGTTGCATATC
RB88R	COI1-a	59.9	24	CRCTCTATCCTAAGCCTTTTCAGC
RB89F	COI1-b	60.0	23	CTACTCTTGGCTTGCTGCATATT
RB89R	COI1-b	58.9	22	CTCAATCCTAAGCCTCCTCAAT
RB90F	JAR1	58.9	23	GAAGAGATTTGTGCTGACATACG
RB90R	JAR1	58.1	26	TACCATATATGTACTTGGCATTAGGA
RB91F	PAL-a	61.0	20	CTCAGTGGCTTGGTCCTCAG
RB91R	PAL-a	59.7	20	TGAGCTTTCCAATAGCTGCA
RB92F	PAL-b	61.2	20	CTCAATGGCTTGGTCCTCAA
RB92R	PAL-b	60.4	18	AATTTTCCAATGGCGGCT
RB93F	GLP-a	61.0	21	CAACCAAACAGCCAAGGTACA
RB93R	GLP-a	61.8	20	GCGTAGTCAATGCGGACAAG
RB94F	GLP-b	59.7	22	GATCCAAAATAGCCAAGGTATGG
RB94R	GLP-b	58.7	22	ATAGTCGRACGAGCAATGGAA
RB95F	PR1	60.5	21	CCTAGCTAAAAGGCAGTGGCTC
RB95R	PR1	60.3	19	GCTGGCACACGTATTTCGTC

L'amplification des gènes candidats avec les amorces spécifiques a été réalisée en

utilisant l'ADN extrait à partir des six génotypes décrits dans le paragraphe 2.1. ; les produits d'amplification ont été séquencés. Lorsque des clones différents ont été obtenus à partir d'un même gène candidat, des amorces spécifiques de chacun de ces clones ont été conçues.

Les réactions PCR ont été réalisées avec 100 ng d'ADN dans 25  $\mu$ L de milieu réactionnel comprenant 2 mM de  $MgCl_2$ , 1X de tampon DNA polymérase (Uptitherm, Interchim), 0,2 mM de dNTP, 0,15 U de Taq polymérase (Uptitherm, Interchim), 0,2  $\mu$ M d'amorce forward, 0,2  $\mu$ M d'amorce reverse et de l'eau milli-Q q.s.p. 25  $\mu$ L. Pour ces réactions PCR, nous avons utilisé le programme suivant : dénaturation à 94 °C pendant 3 min, puis 34 cycles comprenant chacun 30 s de dénaturation à 94 °C, 30 s d'hybridation à une température correspondant au  $T_m$  moyen du couple d'amorces moins 5 °C, 30 s d'élongation à 72 °C, élongation finale à 72 °C pendant 5 min, et enfin 10 min à 4 °C (thermocycleur C1000 Thermal Cycler (BIORAD)).

Les produits PCR obtenus ont été révélés comme décrit précédemment puis envoyés pour séquençage. Ce séquençage a été effectué en double lecture, auprès de la société GATC Biotech, en utilisant les amorces ayant servi pour l'amplification de la séquence d'intérêt.

Comme précédemment, les deux lectures d'une même séquence ont été assemblées en contig et une séquence consensus a été définie. Les séquences obtenues chez nos six génotypes ont ensuite été alignées avec le logiciel ClustalW.

## 2.4. Étude de l'expression de gènes des voies de signalisation

### 2.4.1. Obtention du matériel végétal inoculé par *A. dauci*

L'inoculation a été faite selon le même protocole que celui décrit dans le chapitre III (cf. §2.2.). En serre, chaque génotype a été semé (20 semences sur une ligne, placées à 1,5 cm de profondeur et recouvertes de sable) dans une caisse (60  $\times$  40  $\times$  23 cm) contenant un mélange composé de  $\frac{1}{3}$  sable et de  $\frac{2}{3}$  de terreau horticole (Substrat 5, Klasmann). L'inoculation a été réalisée sur des plantes âgées de six semaines, selon le protocole d'inoculation en goutte (Boedo *et al.*, 2010), avec une suspension de conidies à 200 conidies.mL<sup>-1</sup>. Les plantes témoins ont été traitées avec de l'eau contenant 0,05 % de Tween 20. Pour chaque génotype, nous avons effectué quatre prélèvements : un premier prélèvement à sept jours après inoculation, un second à neuf jours, un troisième à treize jours et un prélèvement témoin effectué à treize jours après l'application d'eau sur les plantes. Chaque semis a été effectué trois fois avec un décalage d'une semaine entre chaque expérimentation (trois répétitions).

## 2.4.2. Mesure de l'expression de gènes

### 2.4.2.1. Transcription inverse de l'ARN

Les ARN extraits ont servi de matrice pour une transcription inverse (RT). La RT a été effectuée en additionnant 15 µL d'ARN dilués à 50 ng.µL<sup>-1</sup> à un mélange composé de 1 mM de chaque dNTP, 1,3 µM d'Oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega), 200 U de Transcriptase Réverse M-MLV (Promega) et le tampon de réaction M-MLV à la concentration 1X (Promega) puis le volume final a été ajusté à 30 µL avec de l'eau RNase free (traitée DEPC). Le mélange a été incubé pendant 1 h à 37 °C, puis 10 min à 80 °C dans un thermocycleur (C1000 Thermal Cycler, BIORAD). Les ADNc obtenus ont été dilués 10 fois avec de l'eau RNase free (traitée DEPC).

### 2.4.2.2. Définition des amorces

Les amorces ont été conçues avec le logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems®), à partir des séquences obtenues chez la carotte (Tab. X).

**Tableau X :** Amorces conçues à partir des fragments clonés spécifiques de l'espèce carotte : Amorces définies pour l'étude de l'expression des gènes des voies de signalisation par PCR en temps réel. Légendes : qti\_xxxF : amorce forward ; qti\_xxxR : amorce reverse.

Nom	Gène cible	Tm (°C)	Longueur (pb)	Séquence 5'-3'
qti_JAR1F	JAR1	52.2	23	TTACTGATCCAACCATTCGAACA
qti_JAR1R	JAR1	52.3	21	CAATTGCTTAACCCCGAACAC
qti_PR4F	PR4	54.5	23	AAGAATCCTGTGGCAAGTGCTTA
qti_PR4R	PR4	54.8	21	GGCCACCATTACTGCACTGAT
qti_ERF2F	ERF2	55.1	22	CACTCTTCCCCTCTACCACAA
qti_ERF2R	ERF2	54.3	23	TCTTCTTGCTTATGACCCGTGTT
qti_PR1F	PR1	54.5	21	AAAGGCAGTGGCTCATTACA
qti_PR1R	PR1	55.6	20	GCACACGTATTCGTGCGGTA

### 2.4.2.3. Sélection de gènes de ménage

La sélection des gènes de ménage a été réalisée à partir de données issues de publications. Il a été déterminé que les gènes EF1α, ARNr 18S, Tubuline β et Actine présentent une expression stable et ce quel que soit le stress appliqué (Nicot *et al.*, 2005). Les séquences nucléotidiques de ces gènes chez la carotte ou le tournesol (Asteracée, famille proche des Apiacées) ont été récupérées dans la base de données NCBI.

Les amorces des quatre gènes sélectionnés ont été conçues avec le logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems®) ou, pour le gène EF1α, étaient déjà disponibles au laboratoire (Clotault *et al.*, 2008) ; les séquences de ces amorces sont regroupées dans le tableau XI.

**Tableau XI** : Amorces définies pour l'étude de l'expression des gènes de ménage, calibrateurs internes de la PCR en temps réel. Légendes : xxxF : amorce forward ; xxxR : amorce reverse.

Nom	Gène cible	Tm (°C)	Longueur (pb)	Séquence 5'-3'
18sF	ARNr 18s	54.4	24	TCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTG
18sR	ARNr 18s	54.5	23	GCCAAGGCTATAGACTCGTTGAA
ActineF	Actine	52.0	20	CCACACGGTGCCAATTTATG
ActineR	Actine	54.3	18	GATCACGGCCAGCAAGGT
TubulineF	Tubuline β	54.3	21	GCCGAGAGCAACATGAATGAC
TubulineR	Tubuline β	54.4	27	CCTGTTTCATCTTCGTAGTAATCTTCCT
EF1aF	EF1α	55.1	19	GGAACCTCTCAGGCTGATTGTG
EF1aR	EF1α	53.0	22	TTGGAGATACCAGCTTCAAAACC

#### 2.4.2.4. Réaction de PCR quantitative

Les réactions PCR ont été effectuées avec l'appareil StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). La méthode utilisée a été la méthode standard de l'appareil correspondant aux réactifs standards fournis par Applied Biosystems.

Chaque échantillon a été déposé dans trois puits (triplicats) d'une plaque 96 puits. Au sein de chaque plaque, en plus des échantillons d'ADNc, nous avons déposé un témoin négatif (ADNc remplacé par de l'eau ultra-pure stérile) et quatre concentrations d'une gamme de dilution d'ADNc. Pour constituer cette gamme de dilution, nous avons utilisé un mélange équimolaire d'ADNc prélevés dans chacun des échantillons à analyser ; ce mélange d'ADNc a été utilisé pour l'ensemble des réactions effectuées.

Un mélange de réaction a été préparé pour chaque échantillon, contenant 2,5 µL de solution d'ADNc (dilué 10 fois), 3 µL d'un mélange d'amorces (sens + antisens) à 5 µM et 7 µL d'eau ultra-pure stérile. Le SYBR Green® PCR Master Mix (12,5 µL) est ajouté à chaque échantillon.

#### 2.4.3. Méthode d'analyse des données

Pour chaque réaction PCR, le cycle pour lequel le seuil de détection a été atteint est appelé le cycle seuil ou cycle threshold (Ct). Pour chacun des échantillons, la valeur moyenne des Ct des trois répliquats techniques a été utilisée. Pour chaque couple d'amorces (donc pour chaque gène, noté g), le modèle d'équation  $Ct_g = -a_g \log_{10}([ADNc]) + b_g + \varepsilon_g$  des Ct obtenus en fonction de la concentration en ADNc correspondant à la gamme étalon, a été obtenu par régression linéaire ; le coefficient de corrélation de cette régression a été déterminé. On note  $Ct_g^e$  le Ct obtenu avec le gène g dans l'échantillon e. La régression précédente permet de calculer, à une constante près, le nombre  $N_g^e$  de copies du gène g dans l'échantillon e avec l'équation  $\log_{10}(N_g^e) = \left( \frac{b_g - Ct_g^e}{a_g} \right)$ . Elle permet également de mesurer

l'efficacité  $E_g = 10^{\left(\frac{1}{a_g}\right)} - 1$  de la réaction qPCR.

Les niveaux relatifs d'expression des gènes candidats ont été calculés selon une méthode inspirée de la méthode de Pfaffl (2001). Ce calcul prend en compte les efficacités des différentes réactions de qPCR. Il permet de plus d'utiliser en parallèle plusieurs gènes standards, et d'obtenir des résultats statistiquement analysables. En effet, en faisant l'hypothèse (en général vérifiée) que la variation de  $Ct_g^e$  entre les répliquats techniques suit une loi normale de variance  $V_g^e$ , celle du ratio  $r$  défini par Pfaffl ne suit pas une loi normale. En revanche, le logarithme du ratio  $r$  suit une loi normale.

En appelant  $m$  un gène de ménage, et  $t$  un échantillon témoin non induit, on peut noter la formule de Pfaffl ainsi :

$$r_g^e = \frac{(E_g+1)^{Ct_g^t - Ct_g^e}}{(E_m+1)^{Ct_m^t - Ct_m^e}} \quad 1.$$

$$\text{d'où } \log_{10}(r_g^e) = (Ct_g^t - Ct_g^e) \times \log_{10}(E_g + 1) - (Ct_m^t - Ct_m^e) \times \log_{10}(E_m + 1)$$

$$\text{or, } \log_{10}(E_g + 1) = \frac{1}{a_g} \text{ et } \log_{10}(E_m + 1) = \frac{1}{a_m}$$

$$\text{donc, } \log_{10}(r_g^e) = \frac{(Ct_g^t - Ct_g^e)}{a_g} - \frac{(Ct_m^t - Ct_m^e)}{a_m} \quad 2.$$

L'équation 2 présente deux avantages :

- Il est possible de calculer une variance technique de  $\log_{10}(r_g^e)$  à partir des variances techniques des Ct mesurées à partir des répliquats :

$$V(\log_{10}(r_g^e)) = \frac{(V_g^t + V_g^e)}{(a_g)^2} + \frac{(V_m^t + V_m^e)}{(a_m)^2}$$

- Il est possible de calculer  $\log_{10}(r_g^e)$  en utilisant comme standard plusieurs gènes de ménage. Par exemple, avec deux gènes de ménages  $m_1$  et  $m_2$  :

$$\log_{10}(r_g^e) = \frac{(Ct_g^t - Ct_g^e)}{a_g} - \frac{1}{2} \left( \frac{(Ct_{m_1}^t - Ct_{m_1}^e)}{a_{m_1}} + \frac{(Ct_{m_2}^t - Ct_{m_2}^e)}{a_{m_2}} \right)$$

#### 2.4.4. Analyses statistiques

À partir des répliquats techniques, des variances ont été calculées. Elles ont permis de calculer des écarts types, des erreurs types et des intervalles de confiance pour les différentes valeurs de  $\log_{10}(r_g^e)$ .

En parallèle, des modèles linéaires ont été utilisés pour étudier séparément l'effet de la variété ou celui de la date de prélèvement (jours après inoculation). Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 2.12.2 (R Development Core Team [Internet]). L'homoscédasticité des paramètres a été vérifiée par le test de Breusch-Pagan. La comparaison des valeurs moyennes a été effectuée à l'aide du test de comparaison multiple de Waller Duncan.

## 3. Résultats

### 3.1. Niveau d'expression de gènes des voies de signalisation liées à l'acide jasmonique, l'éthylène ou l'acide salicylique

Les données présentées dans cette partie ont été obtenues à partir d'une seule répétition biologique, les échantillons issus des deux autres répétitions n'ont, à cette date, pas encore été analysés. Nous présentons donc ici des tendances qu'il conviendra de confirmer. Le traitement des échantillons correspondant aux deux autres répétitions va être effectué dans le cadre d'un stage de Master 1 courant 2013 (Alexandre LEGRAIN).

#### 3.1.1. Calcul des niveaux d'expression des gènes

##### 3.1.1.1. Niveaux d'expression brute des gènes cibles et des gènes de ménage, et calcul de l'efficacité des amorces

Les amorces conçues pour l'amplification par PCR en temps réel ont été testées sur une gamme de dilution d'ADNc afin de déterminer leur efficacité. Les Ct observés en fonction de la concentration d'ADNc sont représentés, pour chacun des gènes cibles et gènes de ménage, en Annexe 5. Une régression linéaire a permis de déterminer, pour chaque couple d'amorce utilisé, l'équation  $Ct_g = -a_g \log_{10}([ADNc]) + b_g$  et les coefficients de corrélation correspondants. Les efficacités E calculées sont variables et vont de 64 à 87 % (moyenne = 75 %, écart-type = 9%) avec des coefficients de corrélation  $R^2$  élevés allant de 0,9587 à 0,9996 (moyenne = 0,9878, écart-type = 0,0125).

##### 3.1.1.2. Validation des gènes de ménage

Afin de normaliser les résultats, nous avons testé quatre gènes de ménage sélectionnés d'après la littérature. Nous avons mesuré l'expression de ces quatre gènes sur l'ensemble de nos échantillons d'ADNc et réalisé une matrice de corrélation des Ct obtenus. Les coefficients

de corrélation  $r$  ont été calculés (Tab. XII).

Les valeurs des coefficients de corrélation s'étalent entre 0,47 et 0,94. La combinaison des gènes ARNr 18S et EF1 $\alpha$  permet d'obtenir des coefficients de corrélation supérieurs à 0,67, soit globalement les valeurs les plus élevées du tableau. Par ailleurs, sur les quatre gènes testés, les gènes de l'actine et de la tubuline  $\beta$  ont un niveau moyen d'expression faible, c'est-à-dire un Ct moyen élevé dépassant 30 (valeurs respectives de 32,99 et 33,35).

**Tableau XII :** Coefficients de corrélation  $r$  entre les valeurs de Ct obtenus pour chacun des gènes de ménage sur l'ensemble des échantillons d'ADNc.

	ARNr 18s	EF1 $\alpha$	Actine	Tubuline $\beta$	Moyenne (ARNr 18s/EF1 $\alpha$ )
ARNr 18s	1				
EF1 $\alpha$	0,6988	1			
Actine	0,7025	0,6298	1		
Tubuline $\beta$	0,4731	0,7404	0,5172	1	
Moyenne (ARNr 18s/EF1 $\alpha$ )	0,9046	0,9370	0,7183	0,6721	1

À partir de la comparaison des coefficients de corrélation et de ces valeurs de Ct, nous avons retenu, les gènes ARNr 18s et EF1 $\alpha$  comme gènes de ménage. Afin d'obtenir un meilleur standard pour la normalisation de l'expression des échantillons, nous avons utilisé les valeurs moyennes des Ct obtenus pour ces deux gènes.

### 3.1.2. Recherche de gènes différentiellement exprimés en fonction des génotypes et de l'inoculation par *Alternaria dauci*

La valeur de Ct obtenue pour chacun des échantillons a permis de calculer la valeur du  $\log_{10}(N_g^e)$ . Cette valeur a été normalisée par la soustraction avec la valeur  $\log_{10}(N_g^e)$  moyenne des deux gènes de ménages retenus (ARNr 18s et EF1 $\alpha$ ). Les gènes cibles étudiés sont les gènes JAR1, PR4 (voie de l'acide jasmonique), ERF2 (voie de l'éthylène) et PR1 (voie de l'acide salicylique).

Sur les valeurs normalisées, le modèle linéaire ' $\ln = \log_{10}(N_g^e) \sim$  date de prélèvement', montre un effet significatif de la date de prélèvement (jours après inoculation) pour le gène PR4, tous génotypes confondus (cf. Annexe 6) ; cet effet n'est pas observé avec les autres gènes cibles (résultats non présentés). Une analyse de variance sur les valeurs de l'expression de PR4 en fonction de la date de prélèvement des feuilles après inoculation, indique que le niveau d'expression mesuré à 13 jours après inoculation est significativement plus élevé comparativement à ceux de l'échantillon témoin et du prélèvement à 7 jours après inoculation (test de comparaison de Waller-Duncan, Annexe 6).

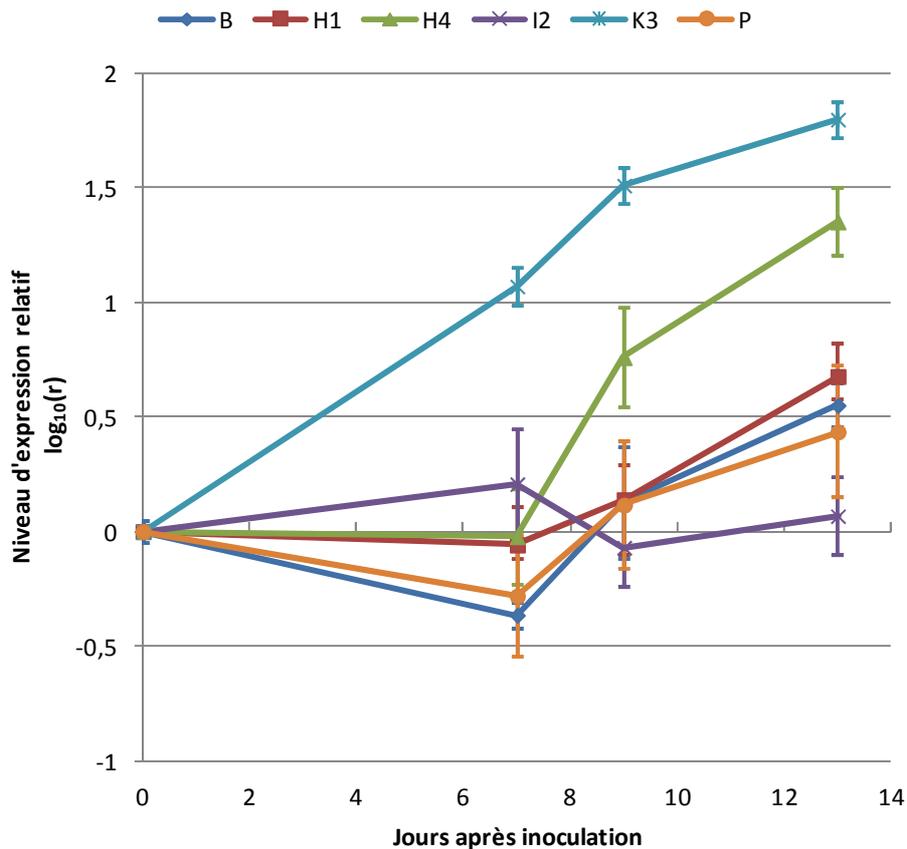
Nous avons également utilisé le modèle linéaire ' $\ln = \log_{10}(N_g^e) \sim$  génotype' ; celui-ci

met en évidence que l'expression du gène *PR4* est en moyenne plus élevée, mais non significativement différente, chez le génotype K3 comparativement aux autres génotypes (Presto, Boléro, H1, H4 et I2), toutes dates de prélèvement confondues (cf. Annexe 6).

Nous ne pouvons pas vérifier l'existence d'une interaction 'date de prélèvement\*génotype' car l'ensemble des échantillons n'est pas encore analysé (une seule répétition biologique analysée sur les trois prévues).

### 3.1.3. Expression du gène *PR4*

Le gène *PR4* est différenciellement exprimé dans nos échantillons (Fig. 36). En effet, le niveau d'expression  $\log_{10}(r_g^e)$  de celui-ci est significativement plus important pour le génotype résistant K3 à J+7, J+9 et J+13 après inoculation, comparativement aux autres génotypes. À un niveau moins important que chez le génotype K3, l'expression de *PR4* est également induite chez le génotype H4 à J+9 et J+13 après inoculation comparativement aux autres génotypes étudiés.



**Figure 36 :** Expression du gène *PR4* chez les six génotypes en fonction du temps après inoculation. Les barres d'erreur représentent les erreurs types calculées à partir des variances techniques (variance des trois réplicats).

En revanche, l'expression du gène *PR4* reste relativement constante chez le génotype

résistant I2 en fonction de la date d'inoculation. À 7, 9 et 13 jours après inoculation, l'expression de *PR4* est du même niveau pour les géotypes Presto, H1 ou Boléro. Ces résultats ont été obtenus à partir d'une seule répétition et sont donc à confirmer.

## **3.2. Recherche de polymorphisme dans des gènes de la voie de l'acide jasmonique**

### ***3.2.1. Conception des amorces dégénérées***

À partir de la bibliographie, 19 gènes candidats ont été sélectionnés (Tab. VIII, § 2. Matériel et Méthodes). Quinze gènes sont liés à la synthèse de l'acide jasmonique, la voie de signalisation ou les défenses liées à cette hormone. Les gènes *PR1* et *ERF2* ont été utilisés en tant que représentants des voies de l'acide salicylique et de l'éthylène. Deux gènes supplémentaires ont été considérés : le gène *PAL* de par son rôle clé dans les voies de défense des plantes vis-à-vis des pathogènes et le gène *GLP* du fait de la colocalisation d'un cluster de gènes *GLP* avec un QTL de résistance dans l'interaction riz-*Magnaporthe grisea*. Lors de l'alignement des séquences homologues extraites des bases de données, des zones suffisamment conservées pour permettre la définition de couples d'amorces dégénérées, ont été mises en évidence pour 17 de ces 19 gènes. Pour les gènes *PR-13* et *JMT*, nous n'avons pas pu définir d'amorces dégénérées.

### ***3.2.2. Amplification avec les amorces dégénérées et clonage des produits amplifiés***

Les différentes conditions de PCR (PCR standard, PCR avec gradient de température, PCR Touchdown) et les différentes combinaisons d'amorces dégénérées ont permis d'obtenir des produits d'amplification pour 12 gènes. Aucune amplification n'a été obtenue pour les gènes *PR-5*, *PR-12*, *AOS*, *AOC* et *NINJA*.

Pour les 12 gènes donnant un résultat positif, les produits d'amplification obtenus ont été clonés afin d'être séquencés. Dans le cas où des produits d'amplification de taille différente ont été obtenus avec un même couple d'amorce, nous avons réalisé le clonage des différents produits afin de les séquencer.

### ***3.2.3. Obtention de séquences homologues chez la carotte***

Suite au séquençage des différents clones obtenus, après traduction en acides aminés et

comparaison avec les séquences connues chez d'autres espèces végétales (séquences ayant servi à définir les amorces dégénérées), des séquences homologues chez la carotte ont pu être mises en évidence pour les huit gènes suivants : *PR1*, *ERF2*, *PR4*, *CO11*, *JAR1*, *MYC2*, *PAL* et *GLP*. Notons que pour les gènes *CO11*, *MYC2*, *PAL* et *GLP*, plusieurs séquences ont été obtenues, correspondant potentiellement à des copies différentes du gène recherché. Les séquences nucléotidiques et protéiques de ces huit gènes sont présentées en Annexe 7.

Concernant les gènes *CHI-B*, *LOX2*, *MPK4* et *JAZ3*, les produits obtenus et séquencés ne correspondent pas aux séquences des gènes candidats, il s'agit de séquences amplifiées de façon aléatoire par l'utilisation des amorces dégénérées.

#### ***3.2.4. Polymorphisme des gènes candidats observé chez les six génotypes sélectionnés***

À partir des séquences homologues obtenues précédemment, des amorces spécifiques de l'ADN de carotte ont été conçues (Tab. IX, § 2. Matériel et Méthodes) et ont permis, après séquençage des produits amplifiés, de comparer la séquence de chaque gène candidat chez les six génotypes de carotte.

Les séquences de quatre gènes candidats, *JAR1*, *PAL*, *GLP*, *PR1*, ont été obtenues chez les six génotypes de carotte et sont présentées dans les figures 37 à 48 :

```

JAR1-RB90F/RB90R-B      GAAGAGATTTGTGCTGACATACG TGATGGAGTTCTCACAAAGTCGAGTTACTGATCCAACC
JAR1-RB90F/RB90R-H1    GAAGAGATTTGTGCTGACATACG TGATGGAGTTCTCACAAAGTCGAGTTACTGATCCAACC
JAR1-RB90F/RB90R-H4    GAAGAGATTTGTGCTGACATACG TGATGGAGTTCTCACAAAGTCGAGTTACTGATCCAACC
JAR1-RB90F/RB90R-I2    GAAGAGATTTGTGCTGACATACG TGATGGAGTTCTCACAAAGTCGAGTTACTGATCCAACC
JAR1-RB90F/RB90R-P      GAAGAGATTTGTGCTGACATACG TGATGGAGTTCTCACAAAGTCGAGTTACTGATCCAACC
JAR1-RB90F/RB90R-K3    GAAGAGATTTGTGCTGACATACG TGATGGAGTTCTCACAAAGTCGAGTTACTGATCCAACC
*****

JAR1-RB90F/RB90R-B      ATTCGAACAGCTATTGCAAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAATTGGCTAGTTTAATTCAT
JAR1-RB90F/RB90R-H1    ATTCGAACAGCTATTGCAAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAATTGGCTAGTTTAATTCAT
JAR1-RB90F/RB90R-H4    ATTCGAACAGCTATTGCAAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAATTGGCTAGTTTAATTCAT
JAR1-RB90F/RB90R-I2    ATTCGAACAGCTATTGCAAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAATTGGCTAGTTTAATTCAT
JAR1-RB90F/RB90R-P      ATTCGAACAGCTATTGCAAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAATTGGCTAGTTTAATTCAT
JAR1-RB90F/RB90R-K3    ATTCGAACAGCTATTGCAAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAATTGGCTAGTTTAATTCAT
*****

JAR1-RB90F/RB90R-B      GATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCAGCACTTTTCCTAATGCC
JAR1-RB90F/RB90R-H1    GATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCAGCACTTTTCCTAATGCC
JAR1-RB90F/RB90R-H4    GATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCAGCACTTTTCCTAATGCC
JAR1-RB90F/RB90R-I2    GATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCAGCACTTTTCCTAATGCC
JAR1-RB90F/RB90R-P      GATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCAGCACTTTTCCTAATGCC
JAR1-RB90F/RB90R-K3    GATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCAGCACTTTTCCTAATGCC
*****

JAR1-RB90F/RB90R-B      AAGTACATATATGGTA
JAR1-RB90F/RB90R-H1    AAGTACATATATGGTA
JAR1-RB90F/RB90R-H4    AAGTACATATATGGT-
JAR1-RB90F/RB90R-I2    AAGTACATATATGGTA
JAR1-RB90F/RB90R-P      AAGTACATATATGGTA
JAR1-RB90F/RB90R-K3    AAGTACATATATGGTA
*****

>JAR1-RB90F/RB90R-consensus
GAAGAGATTTGTGCTGACATACG TGATGGAGTTCTCACAAAGTCGAGTTACTGATCCAACCATTTCGAACAGCTATTGCAAAACTCCTCAAGCCAA
ATCCTGAATTGGCTAGTTTAATTCATGATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCAGCACTTTTCCTAATGCCAAGTACAT
ATATGGTA

```

**Figure 37** : Séquences du gène *JAR1* obtenues à partir des amorces *RB90F* et *RB90R* chez les six génotypes de carotte. *B* : Boléro ; *P* : Presto. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. La séquence consensus est indiquée à la suite de l'alignement.

Concernant le gène *JAR1* (Fig. 37), une séquence de 196 bp a été obtenue chez chacun des six génotypes. Dans ces séquences nucléotidiques, aucun polymorphisme n'a été mis en évidence entre les génotypes.

```

PAL-RB91F/RB91R-H1      CTCAGTGGCTTGGTCTCAGATTGAAGTCATTTCGATCATCGACTAAATGATTGAAAGAG
PAL-RB91F/RB91R-K3     CTCAGTGGCTTGGTCTCAGATTGAAGTCATTTCGATCATCGACTAAATGATTGAAAGAG
PAL-RB91F/RB91R-B      CTCAGTGGCTTGGTCTCAGATTGAAGTCATTTCGATCATCGACTAAATGATTGAAAGAG
PAL-RB91F/RB91R-P      CTCAGTGGCTTGGTCTCAGATTGAAGTCATTTCGATCATCGACTAAATGATTGAAAGAG
PAL-RB91F/RB91R-I2     CTCAGTGGCTTGGTCTCAGATTGAAGTCATTTCGATCATCGACTAAATGATTGAAAGAG
PAL-RB91F/RB91R-H4     CTCAGTGGCTTGGTCTCAGATTGAAGTCATTTCGATCATCGACTAAATGATTGAAAGAG
*****

PAL-RB91F/RB91R-H1     AGATTAATTCGGTTAATGATAACCCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATAACATG
PAL-RB91F/RB91R-K3     AGATTAATTCGGTTAATGATAACCCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATAACATG
PAL-RB91F/RB91R-B      AGATTAATTCGGTTAATGATAACCCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATAACATG
PAL-RB91F/RB91R-P      AGATTAATTCGGTTAATGATAACCCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATAACATG
PAL-RB91F/RB91R-I2     AGATTAATTCGGTTAATGATAACCCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATAACATG
PAL-RB91F/RB91R-H4     AGATTAATTCGGTTAATGATAACCCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATAACATG
***

PAL-RB91F/RB91R-H1     GTGGCAATTTCCAGGGCACGCCTATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCATTG
PAL-RB91F/RB91R-K3     GTGGCAATTTCCAGGGCACGCCTATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCATTG
PAL-RB91F/RB91R-B      GTGGCAATTTCCAGGGCACGCCTATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCATTG
PAL-RB91F/RB91R-P      GTGGCAATTTCCAGGGCACGCCTATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCATTG
PAL-RB91F/RB91R-I2     GTGGCAATTTCCAGGGCACGCCTATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCATTG
PAL-RB91F/RB91R-H4     GTGGCAATTTCCAGGGCACGCCTATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCATTG
*****

PAL-RB91F/RB91R-H1     CAGCTATTGGAAAGCTCA
PAL-RB91F/RB91R-K3     CAGCTATTGGAAAGCTCA
PAL-RB91F/RB91R-B      CAGCTATTGGAAAGCTCA
PAL-RB91F/RB91R-P      CAGCTATTGGAAAGCTCA
PAL-RB91F/RB91R-I2     CAGCTATTGGAAAGCTCA
PAL-RB91F/RB91R-H4     CAGCTATTGGAAAGCTCA
*****

>PAL-RB91F/RB91R-consensus
CTCAGTGGCTTGGTCTCAGATTGAAGTCATTTCGATCATCGACTAA[G/A]ATGATTGAAAGAGAGAT[T/C]AATTCGGTTAATGATAA[C/T]
CCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATAACATGGTGGCAATTTCCAGGGCACGCCTATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGC
G/T]ATTGCAGCTATTGGAAAGCTCA
    
```

**Figure 38 :** Séquences du gène PAL obtenues à partir des amorces RB91F et RB91R chez les six génotypes de carotte. B : Boléro ; P : Presto. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces et les sites en vert correspondent aux SNPs mis en évidence. La séquence consensus est indiquée à la suite de l'alignement.

```

PAL-RB91F/RB91R-B_3      QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB91F/RB91R-H1_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB91F/RB91R-H4_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB91F/RB91R-I2_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB91F/RB91R-P_3     QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB91F/RB91R-K3_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
*****

PAL-RB91F/RB91R-B_3      AIGK LX
PAL-RB91F/RB91R-H1_3    AIGK LX
PAL-RB91F/RB91R-H4_3    AIGK LX
PAL-RB91F/RB91R-I2_3    AIGK LX
PAL-RB91F/RB91R-P_3     AIGK LX
PAL-RB91F/RB91R-K3_3    AIGK LX
*****
    
```

**Figure 39 :** Alignement des séquences en acides aminés correspondant au gène PAL obtenues à partir des amorces RB91F et RB91R chez les six génotypes de carotte. B : Boléro ; P : Presto.

Pour le gène PAL, l'utilisation du couple RB91F/RB91R a permis l'amplification d'une séquence de 198 bp chez les génotypes. Au sein de cette séquence, quatre sites polymorphes ont été identifiés (Fig. 38). Ces sites polymorphes n'engendrent pas de polymorphisme dans la séquence peptidique après traduction (Fig. 39).

```

PAL-RB92F/RB92R-H4      CTC AATGGCTTGGTCTCAAATTGAAGTGATCAGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAG
PAL-RB92F/RB92R-I2     CTC AATGGCTTGGTCTCAAATTGAAGTGATCAGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAG
PAL-RB92F/RB92R-B      CTC AATGGCTTGGTCTCAAATTGAAGTGATCAGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAG
PAL-RB92F/RB92R-H1     CTC AATGGCTTGGTCTCAAATTGAAGTGATCAGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAG
PAL-RB92F/RB92R-P      CTC AATGGCTTGGTCTCAAATTGAAGTGATCAGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAG
PAL-RB92F/RB92R-K3     CTC AATGGCTTGGTCTCAAATTGAAGTGATCAGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAG
*****

PAL-RB92F/RB92R-H4      AGATCAAATCTGTCAATGATAACCCATTGATTGATGTTCCAGGAACAAGGCTATACATG
PAL-RB92F/RB92R-I2     AGATCAAATCTGTCAATGATAACCCATTGATTGATGTTCCAGGAACAAGGCTATACATG
PAL-RB92F/RB92R-B      AGATCAAATCTGTCAATGATAACCCATTGATTGATGTTCCAGGAACAAGGCTATACATG
PAL-RB92F/RB92R-H1     AGATCAAATCTGTCAATGATAACCCATTGATTGATGTTCCAGGAACAAGGCTATACATG
PAL-RB92F/RB92R-P      AGATCAAATCTGTCAATGATAACCCATTGATTGATGTTCCAGGAACAAGGCTATACATG
PAL-RB92F/RB92R-K3     AGATCAAATCTGTCAATGATAACCCATTGATTGATGTTCCAGGAACAAGGCTATACATG
*****

PAL-RB92F/RB92R-H4      GTGGAAATTTCCAGGGAACCCCAATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAG
PAL-RB92F/RB92R-I2     GTGGAAATTTCCAGGGAACCCCAATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAG
PAL-RB92F/RB92R-B      GTGGAAATTTCCAGGGAACCCCAATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAG
PAL-RB92F/RB92R-H1     GTGGAAATTTCCAGGGAACCCCAATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAG
PAL-RB92F/RB92R-P      GTGGAAATTTCCAGGGAACCCCAATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAG
PAL-RB92F/RB92R-K3     GTGGAAATTTCCAGGGAACCCCAATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAG
*****

PAL-RB92F/RB92R-H4      CCGCCATTGGAAAAATT
PAL-RB92F/RB92R-I2     CCGCCATTGGAAAAATT
PAL-RB92F/RB92R-B      CCGCCATTGGAAAAATT
PAL-RB92F/RB92R-H1     CCGCCATTGGAAAAATT
PAL-RB92F/RB92R-P      CCGCCATTGGAAAAATT
PAL-RB92F/RB92R-K3     CCGCCATTGGAAAAATT
*****

>PAL-RB92F/RB92R-consensus
CTCAATGGCTTGGTCTCAAATTGAAGTGATCAGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAGATCAAATCTGTCAATGATAACCCATTGATTGATGTTCCAGGAACAAGGCTATACATGTTGGCTATAGCCGCCATTGGAAAAATT

```

**Figure 40 :** Séquences du gène PAL obtenues à partir des amorces RB92F et RB92R chez les six génotypes de carotte. B : Boléro ; P : Presto. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces et les sites en vert correspondent aux SNPs mis en évidence. La séquence consensus est indiquée à la suite de l'alignement.

```

PAL-RB92F/RB92R-B_3      QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB92F/RB92R-H1_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB92F/RB92R-K3_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB92F/RB92R-P_3     QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB92F/RB92R-I2_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
PAL-RB92F/RB92R-H4_3    QWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKA IHGGNFQGTP IGVSMDNTRLAIA
*****

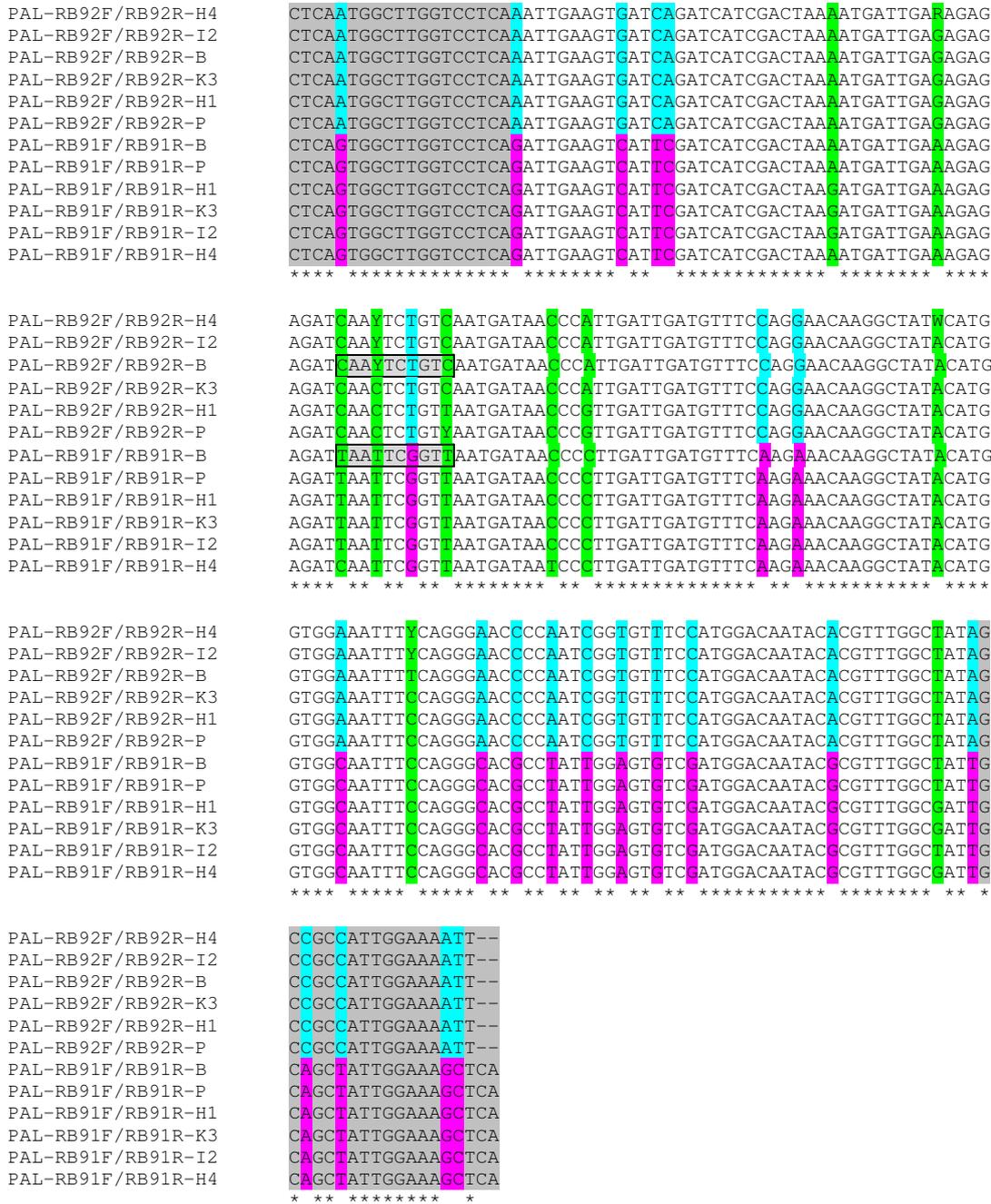
PAL-RB92F/RB92R-B_3      AIGKX
PAL-RB92F/RB92R-H1_3    AIGKX
PAL-RB92F/RB92R-K3_3    AIGKX
PAL-RB92F/RB92R-P_3     AIGKX
PAL-RB92F/RB92R-I2_3    AIGKX
PAL-RB92F/RB92R-H4_3    AIGKX
*****

```

**Figure 41 :** Alignement des séquences en acides aminés correspondant au gène PAL obtenues à partir des amorces RB91F et RB91R chez les six génotypes de carotte. B : Boléro ; P : Presto.

En utilisant le couple d'amorces RB92F/RB92R, nous avons obtenu une séquence de 196 bp présentant six sites polymorphes après alignement des séquences obtenues chez les six génotypes (Fig. 40). Nous avons également mis en évidence la présence d'hétérozygotie parmi les génotypes : par exemple pour le génotype Presto, la présence au site 74 (3<sup>e</sup> SNP mis en évidence) d'un « Y » correspondant soit à une base cytosine, soit à une thymine. Traduites

en acide aminés, ces séquences ne montrent pas de polymorphisme ; les six SNPs mis en évidence ci-dessus sont synonymes (Fig. 41).



**Figure 42 :** Séquences du gène PAL obtenues à partir des amorces RB91F/RB91R et RB92F/RB92R chez les six génotypes. B : Boléro ; P : Presto. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. Les sites en bleu clair et en violet correspondent aux SNPs mis en évidence entre les séquences obtenues avec les amorces RB92F/RB92R et les séquences obtenues avec les amorces RB91F/RB91R. Les sites en vert correspondent aux SNPs mis en évidence entre les six génotypes.

```

PAL-RB91F/RB91R-consensus_3      QWLGPEIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGV
PAL-RB92F/RB92R-consensus_3      QWLGPEIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGV
*****
PAL-RB91F/RB91R-consensus_3      SMDNTRLAIAAIGKLY
PAL-RB92F/RB92R-consensus_3      SMDNTRLAIAAIGKX-
*****

```

**Figure 43 :** Alignement des séquences consensus du gène PAL, traduites en acides aminés (CLUSTAL multiple sequence alignment).

La comparaison des séquences obtenues avec le couple d'amorce RB91F/RB91R et celles obtenues avec le couple RB92F/RB92R, montrent 22 sites polymorphes qui permettent de les différencier (Fig. 42). Après traduction en acides aminés, il s'avère que ces 22 sites polymorphes du point de vue nucléotidique, n'engendrent pas de variabilité dans la séquence protéique traduite (Fig. 43).

Nous sommes en présence de séquences nucléotidiques différentes ; il s'agit vraisemblablement de copies du gène candidat recherché. En effet, pour Boléro, nous observons un site hétérozygote avec le couple RB92F/RB92R au niveau du motif C--Y--T--C (site 65 à 74, cf. sites encadrés Fig. 42), c'est-à-dire C--C--T--C ou C--T--T--C. Or chez ce même génotype, avec le couple RB91F/RB91R, nous avons observé au même endroit le motif T--T--G--T. La carotte étant diploïde, nous ne pouvons observer plus de deux allèles dans le même individu, nous avons donc mis en évidence deux copies du gène *PAL* à partir de deux couples d'amorces distincts.



**Figure 44** : Séquences du gène *GLP* obtenues à partir des amorces *RB93F* et *RB93R* chez les six génotypes de carotte. *B* : Boléro ; *P* : Presto. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces, les zones colorées en jaune à l'intron, les motifs rouges correspondent aux motifs d'épissage de l'intron et les sites en vert correspondent aux SNPs mis en évidence. La séquence consensus est indiquée à la suite de l'alignement.

Pour le gène *GLP*, le couple d'amorces *RB93F/RB93R* a permis l'amplification d'une séquence de 322 bp (*GLP-a*) chez les six génotypes, avec la mise en évidence de 17 sites polymorphes après alignement des séquences (Fig. 44). Notons la présence d'un intron de 122 pb (position 17 à 139). Comme pour le gène *PAL*, nous avons également des sites hétérozygotes pour les génotypes Boléro et Presto.

```

GLPRB93K3_1    QPNSQVLLNGLACKNPSTVQASDFS SGLHISGNTSNAVGSRVTPVAAATQIPGINTLGIS
GLPRB93P_1     ----QVLLNGLACKNPSTVQASDFS SGLHISGNTSNAVGSRVTPVAAATQIPGXNTLGIS
GLPRB93H4_1    QPNSQVLLNGLACKNPSTVQASDFS SGLHISGNTSNAVGSRVTPVAAATQIPGINTLGIS
GLPRB93B_2     ----QVLLNGLACKNPSTVQASDFS SGLHISGNTSNAVGSRVTPVAAATQIPGINTLGIS
GLPRB93H1_1    QPNSQVLLNGLACKNPSTVQASDFS SGLHISGNTSNAVGSRVTPVAAATQIPGINTLGIS
GLPRB93I2_1    QPNSQVLLNGLACKNPSTVQASDFS SGLHISGNTSNAVGSRVTPVAAATQIPGINTLGIS
                ***** ** * ** *

GLPRB93K3_1    LVRIDYX
GLPRB93P_1     LVRX---
GLPRB93H4_1    LVRIDYX
GLPRB93B_2     LVRX---
GLPRB93H1_1    LVRIDYX
GLPRB93I2_1    LVRIDYX
                ***
    
```

**Figure 45 :** Alignement des séquences en acides aminés du gène GLP obtenues à partir des amorces RB93F et RB93R chez les six génotypes. B : Boléro ; P : Presto. Les sites en vert correspondent aux acides aminés polymorphes. Les acides aminés notés en blanc sur fond noir correspondent à des codons hétérozygotes présents chez Boléro et chez Presto. Le codon présent chez Boléro (RCT) code une alanine (A) ou une thréonine (T), celui présent chez Presto (CWT) code une leucine (L) ou une glutamine (Q).

La traduction de cette séquence en acides aminés, montre des résidus polymorphes (Fig. 45). Pour Boléro, le résidu noté « X » (indéterminé) représente soit un résidu alanine (A) soit un résidu thréonine (T). Pour Presto, le résidu « X » représente un résidu leucine (L) ou glutamine (Q). De plus, les génotypes H1 et I2 se distinguent des autres au niveau des sites 267 (résidus A pour les génotypes H1 et I2, T pour les autres génotypes) et 292 (résidu Q pour H1 et I2, L pour les autres génotypes).

```

GLP-RB94F/RB94R-B    CCGAATAGCCAAGCTATGGTAATGTGCATGCATGCTTAACTTATAICGGATTTTCTGGCA
GLP-RB94F/RB94R-H1  -----CAAGCTATGGTAATGTGCATGCATGCTTAACTTATAICGGATTTTCTGGCA
GLP-RB94F/RB94R-P    -----CAAGCTATGGTAATGTGCATGCATGCTTAACTTATAICGGATTTTCTGGCA
GLP-RB94F/RB94R-H4  -----CAAGCTATGGTAATGTGCATGCATGCTTAACTTATAICGGATTTTCTGGCA
                *****

GLP-RB94F/RB94R-B    TGTGTCTATGTGCACATATTGGTGTTTGGTTCATGGTTAATGAGCCCGGTTAACAGGGAT
GLP-RB94F/RB94R-H1  TGTGTCTATGTGCACATATTGGTGTTTGGTTCATGGTTAATGAGCCCGGTTAACAGGGAT
GLP-RB94F/RB94R-P    TGTGTCTATGTGCACATATTGGTGTTTGGTTCATGGTTAATGAGCCCGGTTAACAGGGAT
GLP-RB94F/RB94R-H4  TGTGTCTATGTGCACATATTGGTGTTTGGTTCATGGTTAATGAGCCCGGTTAACAGGGAT
                *****

GLP-RB94F/RB94R-B    CGGAACCTTAATCCCATACAAGTGTGGATTAGTTATTTGGTGCCATGGAATGGGAAC
GLP-RB94F/RB94R-H1  CGGAACCTTAATCCCATACAAGTGTGGATTAGTTATTTGGTGCCATGGAATGGGAAC
GLP-RB94F/RB94R-P    CGGAACCTTAATCCCATACAAGTGTGGATTAGTTATTTGGTGCCATGGAATGGGAAC
GLP-RB94F/RB94R-H4  CGGAACCTTAATCCCATACAAGTGTGGATTAGTTATTTGGTGCCATGGAATGGGAAC
                *****

GLP-RB94F/RB94R-B    CCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCCTTCCCACCCTTGGGTTACCATACCATTCC
GLP-RB94F/RB94R-H1  CCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCCTTCCCACCCTTGGGTTACCATACCATTCC
GLP-RB94F/RB94R-P    CCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCCTTCCCACCCTTGGGTTACCATACCATTCC
GLP-RB94F/RB94R-H4  CCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCCTTCCCACCCTTGGGTTACCATACCATTCC
                *****

GLP-RB94F/RB94R-B    TGATTCTCATTAAACCCCATTTCCCATACCCTCCATTCCCATTTCCGATTCCCATTTCTAA
GLP-RB94F/RB94R-H1  TGATTCTCATTAAACCCCATTTCCCATACCCTCCATTCCCATTTCCGATTCCCATTTCTAA
GLP-RB94F/RB94R-P    TGATTCTCATTAAACCCCATTTCCCATACCCTCCATTCCCATTTCCGATTCCCATTTCTAA
GLP-RB94F/RB94R-H4  TGATTCTCATTAAACCCCATTTCCCATACCCTCCATTCCCATTTCCGATTCCCATTTCTAA
                *****

GLP-RB94F/RB94R-B    CCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGTGCAGACACTTTTATCTCCACATCACCT
GLP-RB94F/RB94R-H1  CCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGTGCAGACACTTTTATCTCCACATCACCT
GLP-RB94F/RB94R-P    CCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGTGCAGACACTTTTATCTCCACATCACCT
GLP-RB94F/RB94R-H4  CCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGTGCAGACACTTTTATCTCCACATCACCT
                *****
    
```

```

GLP-RB94F/RB94R-B      CAAACTGTACACTAACACAGGACACCATGTCCCTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAA
GLP-RB94F/RB94R-H1    CAAACTGTACACTAACACAGGACACCATGTCCCTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAA
GLP-RB94F/RB94R-P      CAAACTGTACACTAACACAGGACACCATGTCCCTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAA
GLP-RB94F/RB94R-H4    CAAACTGTACACTAACACAGGACACCATGTCCCTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAA
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      ATAAAAGAAAATATGTTGTCGACAAGTTACTTTTAAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCA
GLP-RB94F/RB94R-H1    ATAAAAGAAAATATGTTGTCGACAAGTTACTTTTAAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCA
GLP-RB94F/RB94R-P      ATAAAAGAAAATATGTTGTCGACAAGTTACTTTTAAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCA
GLP-RB94F/RB94R-H4    ATAAAAGAAAATATGTTGTCGACAAGTTACTTTTAAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCA
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      CTGCATTGTGGATGCTCTAACACCACCTTTTAGTTAGGTGACGGATTGTATTGACTCT
GLP-RB94F/RB94R-H1    CTGCATTGTGGATGCTCTAACACCACCTTTTAGTTAGGTGACGGATTGTATTGACTCT
GLP-RB94F/RB94R-P      CTGCATTGTGGATGCTCTAACACCACCTTTTAGTTAGGTGACGGATTGTATTGACTCT
GLP-RB94F/RB94R-H4    CTGCATTGTGGATGCTCTAACACCACCTTTTAGTTAGGTGACGGATTGTATTGACTCT
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      GATTTTCATTAATAATGATGGTCCCCACATGCATAAAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTC
GLP-RB94F/RB94R-H1    GATTTTCATTAATAATGATGGTCCCCACATGCATAAAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTC
GLP-RB94F/RB94R-P      GATTTTCATTAATAATGATGGTCCCCACATGCATAAAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTC
GLP-RB94F/RB94R-H4    GATTTTCATTAATAATGATGGTCCCCACATGCATAAAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTC
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      CACTTAGATAAAAAATAATTTTGGATTACTTCTAATTATCTAGTACTTGATTGATGAATT
GLP-RB94F/RB94R-H1    CACTTAGATAAAAAATAATTTTGGATTACTTCTAATTATCTAGTACTTGATTGATGAATT
GLP-RB94F/RB94R-P      CACTTAGATAAAAAATAATTTTGGATTACTTCTAATTATCTAGTACTTGATTGATGAATT
GLP-RB94F/RB94R-H4    CACTTAGATAAAAAATAATTTTGGATTACTTCTAATTATCTAGTACTTGATTGATGAATT
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      CTGTTCTTATTTCAGTGTCTGGTAAATGGACTTGTTTGTAAGAACC CGAACACGCGACTG
GLP-RB94F/RB94R-H1    CTGTTCTTATTTCAGTGTCTGGTAAATGGACTTGTTTGTAAGAACC CGAACACGCGACTG
GLP-RB94F/RB94R-P      CTGTTCTTATTTCAGTGTCTGGTAAATGGACTTGTTTGTAAGAACC CGAACACGCGACTG
GLP-RB94F/RB94R-H4    CTGTTCTTATTTCAGTGTCTGGTAAATGGACTTGTTTGTAAGAACC CGAACACGCGACTG
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      CAGAGGACTTCTTACCAGTGGATTGAATGAAGCAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGAT
GLP-RB94F/RB94R-H1    CAGAGGACTTCTTACCAGTGGATTGAATGAAGCAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGAT
GLP-RB94F/RB94R-P      CAGAGGACTTCTTACCAGTGGATTGAATGAAGCAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGAT
GLP-RB94F/RB94R-H4    CAGAGGACTTCTTACCAGTGGATTGAATGAAGCAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGAT
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      CAAATGTAACCTCTAGTGAATGTTGTCGGATTCCCTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCCA
GLP-RB94F/RB94R-H1    CAAATGTAACCTCTAGTGAATGTTGTCGGATTCCCTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCCA
GLP-RB94F/RB94R-P      CAAATGTAACCTCTAGTGAATGTTGTCGGATTCCCTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCCA
GLP-RB94F/RB94R-H4    CAAATGTAACCTCTAGTGAATGTTGTCGGATTCCCTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCCA
*****

GLP-RB94F/RB94R-B      TTGCTC
GLP-RB94F/RB94R-H1    TTGCTC
GLP-RB94F/RB94R-P      TTGCTC
GLP-RB94F/RB94R-H4    TTGCTC
*****

```

```

>GLP-RB94F/RB94R-consensus
CAAGGATGGTAATGTGCATGCATGCTTAACCTATATCGGATTTCTGGCATGTGTCTATGTGCACATATTGGTGTGGTTTCATGGTTAATGA
GCCCGGTTAACAGGGATCGGAACCTTAATCCCAATAACAAGTGTGGATTAGTTATTTGGTGCCATGGAATGGGAACCCCAATCCTTTTAGGTG
GTTAAATCATACCCTTCCACCCTTGGGTTACCATAACCACTTCTGATCTCATTAAACCCCATTCCCATACCCTCCATTCCCATCCCGATTCC
CATTCTAACCTCAATCCAAACGCCCTAAGAATACTCAGTGCAGACACTTTTATCTCCACATCACCTCAAACCTGTACACTAACACAGGACA
CCATGTCCCTGGCCACTTCTGCTCCTCTCATAAAATAAAAAGAAAATATGTTGTCGACAAGTTACTTTTAAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCC
ACTGCATTGTGGATGCTCTAACACCACCTTTTAGTTAGGTGACGGATTGTATTGACTCTGATTTTCATTAATAATGATGGTCCCCACATGCAT
AAAAATTTTACCAGGCAAAATCTCCACTTAGATAAAAAATAATTTTGGATTACTTCTAATTATCTAGTACTTGATTGATGAATCTGTCTCT
TATTTTCAGTGTCTGGTAAATGGACTTGTTTGTAAGAACC CGAACACGCGACTGCAGAGGACTTCTTACCAGTGGATTGAATGAAGCAGGGGAC
ACCTCGAATGCAGTTGGATCAATGTAACCTCTAGTGAATGTTGTCGGATTCCCTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCCATTGCTC

```

**Figure 46 :** Séquences du gène GLP obtenues à partir des amorces RB94F et RB94R chez quatre génotypes de carotte. B : Boléro ; P : Presto. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces, les zones colorées en jaune à l'intron et les motifs rouges correspondent aux motifs d'épissage de l'intron. La séquence consensus est indiquée à la suite de l'alignement.

Lors de l'amplification avec le couple d'amorces RB94F/RB94R, nous avons pu obtenir

une séquence *GLP-b* de 860 bp (Fig. 46) pour quatre génotypes (Boléro, H1, Presto et H4) ; aucun site polymorphe n'a été relevé après alignement de ces séquences. La séquence *GLP-b* obtenue chez les quatre génotypes présente un intron plus grand que celui de la séquence *GLP-a* (662 pb).

```

GLP-RB93F/RB93R-consensus_1      QPNSQVLLNGLACKNPSTVQASDFSFSGLHISGNTSNAVGSRVTPVAAXQ
GLP-RB94F/RB94R-consensus_1      ----QVLVNLGLVCKNPNNATAEDFFTSGLNEAGDTSNAVGSNVTLVNVVR
                                   ***:***.***. . . *.**  ***: :*:*****.*** * . :

GLP-RB93F/RB93R-consensus_1      IPGXNTXGISLVRIDYX
GLP-RB94F/RB94R-consensus_1      IPGLNLTLSLSIAX----
                                   *** * .:*.:
```

**Figure 47 :** Alignement des séquences consensus du gène *GLP*, traduites en acides aminés (CLUSTAL multiple sequence alignment).

Comme pour le gène *PAL*, des génotypes tel que Boléro et Presto présentent des sites hétérozygotes avec le premier couple d'amorce (cf. sites encadrés Fig. 44 : un motif W--Y soit A--C ou A--T ou T--C ou T--T) et une séquence avec un intron de taille différente avec le deuxième couple d'amorces ; nous sommes donc là aussi vraisemblablement en présence de deux copies du gène recherché. La comparaison entre les séquences peptidiques consensus des deux copies montrent de nombreuses différences de séquences en plus de la différence de longueur due à l'intron (Fig. 47).

```

PR1-RB95F/RB95R-B      CCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTGCGGTTAACTTGTGGGTGGCTGA
PR1-RB95F/RB95R-H1    CCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTGCGGTTAACTTGTGGGTGGCTGA
PR1-RB95F/RB95R-H4    CCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTGCGGTTAACTTGTGGGTGGCTGA
PR1-RB95F/RB95R-I2    CCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTGCGGTTAACTTGTGGGTGGCTGA
PR1-RB95F/RB95R-P      CCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTGCGGTTAACTTGTGGGTGGCTGA
PR1-RB95F/RB95R-K3    CCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTGCGGTTAACTTGTGGGTGGCTGA
                        *****

PR1-RB95F/RB95R-B      GAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCAGC
PR1-RB95F/RB95R-H1    GAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCAGC
PR1-RB95F/RB95R-H4    GAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCAGC
PR1-RB95F/RB95R-I2    GAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCAGC
PR1-RB95F/RB95R-P      GAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCAGC
PR1-RB95F/RB95R-K3    GAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCAGC
                        *****

>PR1-RB95F/RB95R-consensus
CCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTGCGGTTAACTTGTGGGTGGCTGAGAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCAGC
```

**Figure 48 :** Séquences du gène *PR1* obtenues à partir des amorces *RB95F* et *RB95R* chez les six génotypes de carotte. *B* : Boléro ; *P* : Presto. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. La séquence consensus est indiquée à la suite de l'alignement.

Enfin, la séquence du gène *PR1* a été alignée entre les six génotypes, mais aucun polymorphisme n'a été relevé dans cette séquence de 100 bp (Fig. 48).

## 4. Discussion

Dans ce chapitre nous avons traité deux aspects. Le premier concerne l'expression de gènes suite à l'inoculation par *A. dauci*. Les résultats de cette partie sont préliminaires et restent à confirmer en analysant les échantillons de deux répétitions supplémentaires. Notons tout de même qu'un gène, le gène *PR4*, qui est lié à la voie de l'acide jasmonique, aurait un niveau d'expression supérieur chez la variété résistante K3 en réaction à l'inoculation par *A. dauci* comparativement aux autres génotypes. Pour comparaison avec nos résultats, une étude protéomique de la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à l'infection par *Alternaria brassicicola* (Mukherjee *et al.* 2010) montre que deux protéines sont fortement surexprimées en réponse à l'attaque par le champignon (cas d'une interaction incompatible) : il s'agit d'une glycosylhydrolase (classe *PR4*) et d'une osmotine.

Deux autres gènes ont été testés dans la présente étude, les gènes *PRI* et *ERF2*, ces derniers étant liés à d'autres voies de signalisation (acide salicylique et éthylène). Le niveau d'expression de ces deux gènes ne serait pas dépendant de l'inoculation de la plante par *A. dauci* et nous n'avons pas observé de différence significative entre les génotypes. Le niveau d'expression d'autres gènes de la voie de l'acide jasmonique serait intéressant à analyser avec les mêmes modalités de traitement que celles présentées pour le gène *PR4*.

L'implication de la voie de l'acide jasmonique par l'analyse du niveau d'expression de gènes a été traitée par différents auteurs sur d'autres pathosystèmes que celui qui nous intéresse ici. Prenons par exemple des travaux réalisés dans le cas de l'interaction entre le pommier et *Erwinia amylovora*, bactérie nécrogène responsable du feu bactérien (Dugé de Bernonville, 2009 ; Dugé de Bernonville *et al.*, 2012 ; Gaucher 2012). Dans ces travaux, le niveau d'expression de gènes liés à la voie de l'acide salicylique et de gènes liés à la voie de l'acide jasmonique a été mesuré par qPCR, en comparant un génotype sensible et un génotype résistant. Les auteurs ont montré que suite à l'infection par la bactérie, le génotype sensible montrait une répression des gènes liés à la voie de l'acide jasmonique, répression dépendante du système de sécrétion de type III bactérien. Cette régulation négative n'est pas observée chez le génotype résistant. Les auteurs concluent sur la présence d'un mécanisme de blocage prolongé de la voie de l'acide jasmonique qui correspondrait à un facteur de sensibilité de la

plante.

Par ailleurs, cette même équipe a montré qu'en traitant des pommiers sensibles à *E. amylovora* avec du méthyle jasmonate, une augmentation de la résistance de ces plantes face à la bactérie est observée. Des expériences de traitement de génotypes de carotte avec du méthyl-jasmonate en comparant des lots témoins à des lots inoculés par *A. dauci* pourraient permettre de vérifier si ce régulateur hormonal a une action sur la résistance au champignon.

Outre les régulateurs hormonaux considérés précédemment, l'acide abscissique (ABA), qui est notamment connu pour son rôle dans les phénomènes de dormance, a également un rôle dans la signalisation en lien avec les mécanismes de défense (Cutler *et al.*, 2010). Il aurait en effet un rôle positif dans les défenses d'*A. thaliana* contre certains agents pathogènes nécrotrophes, tels que *Pythium irregulare* et *A. brassicicola* (Adie *et al.*, 2007 ; Flors *et al.*, 2008). Parmi les mécanismes possibles, l'ABA interviendrait dans la synthèse de callose. La voie de signalisation dépendante de l'ABA mériterait d'être également considérée dans de futures études concernant l'interaction carotte-*A. dauci*.

D'autres éléments intervenant dans les voies de réponse des plantes aux agents pathogènes seraient intéressants à étudier. Ainsi des facteurs de transcription de type WRKY ont été identifiés comme ayant un rôle dans des interactions hôte-pathogène (cf. Chapitre I Synthèse bibliographique). La surexpression de VvWRKY1 chez la vigne (Marchive *et al.*, 2013) et de WRKY30 chez le riz (Peng *et al.*, 2012) engendre une augmentation du niveau d'expression de gènes liés à la voie de l'acide jasmonique ainsi qu'une augmentation du niveau de résistance de la plante face à des agents pathogènes, *Plasmopara viticola* dans le cas de la vigne, *Rhizoctonia solani* et *Magnaporthe grisea* dans le cas du riz. Ces facteurs de transcription constituent des candidats potentiellement intéressants qui pourraient en partie expliquer les différences de niveaux de résistances des génotypes étudiés dans le cas de notre pathosystème carotte/*A. dauci*.

Les protéines G hétérotrimères sont des éléments universels de transduction de signal trouvés dans tous les organismes eucaryotes, y compris les plantes. Les protéines G hétérotrimères sont impliquées dans les réponses d'*A. thaliana* face à des champignons nécrotrophes, tels que *Fusarium oxysporum* ou *A. brassicicola* (Trusov *et al.*, 2009). Le niveau d'implication des voies de signalisation médiées par les protéines G dans la résistance à ces deux champignons n'est pas le même : il est plus important dans le cas de l'interaction *Arabidopsis/F. oxysporum* que dans celui impliquant *A. brassicicola*. Les modalités d'intervention des protéines G dans l'interaction plante-pathogène pourraient constituer une autre voie d'approche afin d'étudier les mécanismes de la résistance partielle de la carotte face à *A. dauci*.

L'autre aspect traité dans ce chapitre concerne le polymorphisme de séquences observé dans des gènes candidats. Ces séquences ont été comparées après alignement chez les six génotypes de carotte étudiés (sauf pour une séquence comparée chez quatre génotypes seulement). Des séquences ont été obtenues pour quatre gènes : *JAR*, *PAL*, *GLP*, *PRI*. Les

gènes *JAR* et *PRI* n'ont révélé aucun polymorphisme contrairement aux gènes *PAL* et *GLP*. Pour ces deux derniers gènes, nous avons mis en évidence deux copies chez la carotte, nommées respectivement *PAL-a*, *PAL-b* et *GLP-a*, *GLP-b*.

Le gène *PAL* appartient à une famille multigénique. Récemment, il a été rapporté l'existence de 4 copies du gène *PAL* chez *Arabidopsis thaliana* et chez *Medicago truncatula*, 12 chez le riz et 20 chez le maïs (Rawal *et al.*, 2013). Dans notre étude, des sites polymorphes ont été mis en évidence pour le gène *PAL-a* (Fig. 49). Ce polymorphisme est comparé avec le niveau de résistance des génotypes déterminé dans le chapitre 3 (§3.1.1) selon le critère visuel d'évaluation des symptômes. Les haplotypes H1 et K3 sont identiques d'une part, de même que les haplotypes Boléro et Presto d'autre part : on ne distingue donc pas les séquences en fonction du niveau de résistance pour ces quatre génotypes.

H1	GTCG
P	ATCT
H4	ACTG
I2	GTCT
B	ATCT
K3	GTCG

**Figure 49 :** Haplotypes du gène *PAL-a* obtenus à partir des amorces *RB91F* et *RB91R* chez les six génotypes. B : Boléro ; P : Presto. L'ordre des génotypes de H1 à K3 correspond au niveau croissant de résistance d'après les critères de notations visuelles de la maladie.

Le polymorphisme mis en évidence dans la séquence du gène *PAL-b* est présenté ci-dessous (Fig. 50). Deux sites distinguent les haplotypes selon le niveau de résistance ; un T est présent chez le génotype H1, un Y (c'est-à-dire un T ou un C) est présent chez Presto alors que les autres génotypes qui ont un niveau de résistance supérieur à H1 et Presto, possède une base C à ce locus. De même, pour le deuxième site mis en évidence dans la figure 50, la séquence chez HI et Presto présente un G alors que celle des autres génotypes présente un A. Lorsque l'on traduit les séquences en acides aminés, on s'aperçoit que ces mutations sont silencieuses, car la séquence peptidique est identique entre les six génotypes. Il n'y a donc pas de lien entre le polymorphisme observé au niveau nucléotidique et le niveau de résistance de ces six génotypes.

H1	GCTGAC
P	GCTGAC
H4	RYCAWY
I2	GYCAAY
B	GYCAAT
K3	GCTGAC

**Figure 50 :** Haplotypes du gène *PAL-b* obtenus à partir des amorces *RB92F* et *RB92R* chez les six génotypes. B : Boléro ; P : Presto. L'ordre des génotypes de H1 à K3 correspond au niveau croissant de résistance.

Les *GLP* correspondent également à des familles multigéniques chez les plantes (pour exemple voir Zimmermann *et al.*, 2006). Nos résultats ont permis de mettre en évidence deux copies de gène *GLP*, mais une seule se montre polymorphe entre les six génotypes, la

séquence *GLP-b* (Fig. 51). Les haplotypes H1 et I2 sont identiques. De même que les haplotypes H4 et K3. En revanche les deux génotypes les plus éloignés du point de vue de leur résistance à *A. dauci*, H1 et K3, se distinguent sur la base de cette séquence, nous avons donc une corrélation entre le niveau de résistance et le polymorphisme de séquence nucléotidique.

H1	TTTGTGTGCATCGTAA
P	WYYTYTYTYSCYAWMT
H4	AACCTCCTCTGCTATCT
I2	TTTGTGTGCATCGTAA
B	WYCKYYTYTYSCYRTMT
K3	AACCTCCTCTGCTATCT

**Figure 51 :** Haplotypes du gène *GLP-b* obtenus à partir des amorces *RB93F* et *RB93R* chez les six génotypes. B : Boléro ; P : Presto. L'ordre des génotypes de H1 à K3 correspond au niveau croissant de résistance.

D'un point de vue peptidique, nous avons deux acides aminés de différence dans les séquences de ces deux génotypes (cf. § 3.2.4., Fig. 45) : au niveau d'un 1<sup>er</sup> site, un A pour le génotype H1, un T pour K3 et dans un 2<sup>e</sup> site, un Q pour H1, un L pour K3. Ces acides aminés différents n'appartiennent pas aux mêmes classes. L'alanine (A) est un acide aminé dit hydrophobe ou apolaire et donc neutre, qui se caractérise par une chaîne latérale réduite (un groupement méthyle). La thréonine (T) portant une fonction hydroxyle sur sa chaîne latérale (R) est un acide aminé hydrophile ou polaire et neutre à chaîne latérale ramifiée. La glutamine (Q) qui porte une fonction amide appartient à la même classe d'acide aminé que la thréonine. La leucine (L) appartient à la même classe d'acide aminé que l'alanine mais sa chaîne latérale est ramifiée. La glutamine et la leucine ont un encombrement stérique proche. En revanche, la thréonine a un encombrement stérique nettement supérieur à celui de l'alanine (Lehninger, 1994).

L'alanine et la leucine vont interagir avec les chaînes latérales d'autres résidus hydrophobes ou avec des composés hydrophobes tandis que la thréonine et la glutamine ne le pourront pas : les chaînes latérales de ces résidus vont interagir avec d'autres groupements polaires (composés ou solvants). Ces changements de caractéristiques physico-chimiques des résidus sont donc majeurs et doivent vraisemblablement avoir un impact soit sur le repliement de la protéine, soit sur ses possibilités d'interaction avec son ligand (si les acides aminés modifiés sont situés au niveau du site actif pour une enzyme ou d'un site de fixation de ligand. Donc cela peut être impliqué dans le différentiel de résistance que l'on observe. Pour pouvoir confirmer un changement de repliement, il faudrait avoir la séquence entière du gène et faire de la modélisation *in silico*.

On peut également remarquer que la séquence chez I2 est identique à celle de H1, alors que le niveau de résistance entre ces génotypes est différent d'après les notations visuelles de la maladie. Le niveau de résistance de I2 est par ailleurs inférieur à celui de K3, on peut donc imaginer que la séquence *GLP-b* présente chez K3 expliquerait en partie le niveau de

résistance supérieur par rapport à I2. Le génotype I2 possède une séquence identique à H1 dans le fragment étudié mais il s'agit peut-être tout de même d'un allèle différent avec un polymorphisme situé plus en amont ou en aval de la séquence étudié durant cette thèse. Là encore, une étude de la totalité de la séquence de ce gène permettrait d'en apprendre davantage.

En conclusion, quelques séquences polymorphes ont été mises en évidence entre des génotypes sensibles et partiellement résistants de carotte : les SNPs générés dans le cadre de nos travaux sont utilisés comme marqueurs moléculaires pour les travaux de cartographie des QTL de résistance à *A. dauci* menés dans l'équipe Quarveg de l'UMR IRHS.



## Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés durant cette thèse avaient pour objectif d'apporter des connaissances sur les mécanismes de défense mis en place dans le cadre de la résistance partielle observée chez la carotte face à *A. dauci*. Les différents aspects étudiés et décrits dans le présent document, semblent indiquer que plusieurs mécanismes différents concourent à la résistance partielle observée. De plus, l'implication de chaque mécanisme semble variable d'une variété résistante à l'autre. En effet, deux des six génotypes étudiés ici (K3 et I2), correspondant à des résistances partielles vis-à-vis d'*A. dauci*, ont des comportements différents selon le mécanisme observé (résistance à des fractions toxiques du champignon, implication de mécanismes de défense liés à la voie de l'acide jasmonique). Pour rappel, dans une étude précédente (Boedo *et al.*, 2010), nous avons mis en évidence des résistances qualitativement différentes à ce même agent pathogène, en comparant le comportement des variétés résistantes commerciales Boléro et Texto face à différentes méthodes d'évaluation de la résistance.

Dans le chapitre II, nous avons étudié l'implication de métabolites produits par la carotte dans la résistance partielle de la plante à *A. dauci*. Nous avons montré que deux molécules, la 6-méthoxymelléine, une phytoalexine et le falcarindiol, une phytoanticipine, ont un effet inhibiteur sur le développement du champignon. Notons que la délimitation de ces deux composés en tant que phytoalexine ou phytoanticipine ne serait pas stricte, comme le suggère Hammerschmidt (2012), commentant nos résultats publiés dans la revue *Physiological and Molecular Plant Pathology* (Lecomte *et al.*, 2012b). Après inoculation par le champignon, la 6-méthoxymelléine s'accumule de façon plus importante chez un génotype partiellement résistant (Boléro), en comparaison avec un génotype sensible (Presto). Cette phytoalexine pourrait donc ralentir le développement *in vivo* d'*A. dauci* chez Boléro, comparativement à ce qui est observé dans le génotype sensible. En l'absence d'*A. dauci*, les concentrations en falcarindiol sont plus importantes dans les feuilles de Boléro que dans celles de Presto ; ces concentrations augmentent dans les deux génotypes inoculés par *A. dauci*. Nos résultats montrent que le falcarindiol aurait une action antifongique plus marquée que la 6-méthoxymelléine. Nous avons remarqué un effet additif de ces deux molécules qui suggère un mode d'action différent sur le champignon.

Le même type de conclusion peut être tiré d'une autre série d'expérimentations. En effet, nous avons montré que le falcarindiol provoquerait une perméabilisation de la membrane plasmique. Nous n'avons pas mis en évidence un tel effet dans le cas de la 6-MM. À notre connaissance, il n'existe pas d'éléments tangibles dans la bibliographie qui permettraient d'expliquer le mode d'action de la phytoalexine vis-à-vis d'*A. dauci*. D'après nos résultats,

nous pouvons conclure que le champignon est relativement tolérant à cette molécule et pourrait mettre en œuvre des mécanismes de détoxification, de réduction/suppression de synthèse de la phytoalexine ou des mécanismes d'efflux. Ces mécanismes restent cependant à démontrer dans le cas de l'interaction carotte/*A. dauci*. D'autres molécules à effets antifongiques peuvent exister chez la carotte. Lors du dosage *in planta* de la 6-MM par HPLC, des composés présents dans les extraits végétaux et détectés avec la méthode mise au point pour la phytoalexine sont apparus en concentration différente chez les génotypes résistant et sensible. Il y aurait un intérêt à identifier et caractériser ces molécules de façon précise.

Après s'être intéressés à des composés antimicrobiens produits par la plante en réponse à une attaque pathogène, nous avons, dans le chapitre III, étudié des molécules toxiques produites par l'agent pathogène pour attaquer son hôte et analysé dans quelle mesure certains génotypes de la plante peuvent y résister. Il s'agissait de vérifier le lien entre la résistance de génotypes de carotte au niveau de la plante entière face au champignon et la résistance des cellules végétales de ces mêmes génotypes face aux composés toxiques produits par *A. dauci*. À partir d'un système *in vitro* mis au point durant cette thèse, nous avons pu montrer que les génotypes utilisés ont un comportement différentiel face aux extraits fongiques. Nous avons observé l'effet toxique provoqué par des composés produits par le champignon sur des cellules de carotte ; cet effet toxique a été évalué par différents critères : viabilité des cellules végétales, capacité de formation d'embryons par ces cellules et activité enzymatique générale (test FDA). En ce qui concerne les génotypes à résistance partielle, il est à noter qu'I2 présente une résistance aux composés fongiques d'un niveau supérieur à celle de K3. De plus, nous avons montré que le ou les composés responsables des effets observés se trouvent dans la fraction organique des extraits fongiques, mais que le zinniol ne serait pas impliqué dans le phénomène. La classification du zinniol en tant que phytotoxine a d'ailleurs été récemment mise en cause (Qui et al. 2010).

La résistance partielle de la carotte à *A. dauci* est donc au moins en partie due à une résistance à des composés toxiques produits par le champignon. Cette idée est renforcée par le fait qu'il existe une assez bonne corrélation entre les résultats obtenus sur la résistance aux fractions toxiques des cultures cellulaires et ceux obtenus sur plante entière (résistance évaluée par les notations visuelles ou par quantification de la biomasse fongique par qPCR). Toutefois le génotype le plus résistant face au champignon au niveau de la plante entière (K3) n'est pas celui qui résiste le plus aux composés toxiques (I2). Il existe donc d'autres mécanismes intervenant dans cette résistance partielle. Pour cela, nous avons émis une hypothèse pouvant expliquer autrement la résistance partielle de la carotte à *A. dauci*. Cette hypothèse a fait l'objet du chapitre IV.

D'un point de vue technique, nous pouvons envisager une variante de la méthode FDA afin de quantifier l'effet des extraits fongiques sur les cellules végétales. Il est possible d'effectuer la coloration directe des cellules avec la FDA (les cellules deviennent fluorescentes sous lumière UV après pénétration de la FDA). L'observation microscopique de

ces cellules permet alors une analyse d'image basée sur le calcul des surfaces des cellules vivantes et des cellules mortes. Des tests préliminaires ont été menés au laboratoire, et il semble qu'une observation trois jours après inoculation permette de mettre en évidence un différentiel entre des cellules issues de K3 et celles de H1 (Hamama, com. pers.). Cette méthode permettrait d'alléger le travail lié à la préparation des extraits et la réaction enzymatique, et ainsi d'analyser plus rapidement un nombre important d'échantillons.

D'un point de vue scientifique, nous avons mis en évidence que les composés responsables de l'effet toxique observé sont présents dans la fraction organique des extraits fongiques. La prochaine étape sera de caractériser de façon précise ces composés toxiques. Pour ce faire, la phase organique de l'extrait sera fractionnée par chromatographie préparative. Les fractions obtenues seront ensuite appliquées sur les cellules afin d'évaluer leur toxicité. Ce travail sera réalisé en collaboration avec le laboratoire SONAS. Par ailleurs, il serait également intéressant de tester des extraits fongiques provenant de différentes souches du champignon. En effet la composition de ces extraits varie probablement avec le niveau d'agressivité d'*A. dauci*.

Dans le chapitre IV, nous nous sommes intéressés aux gènes de défense décrits chez les plantes. *A. dauci* étant un champignon nécrotrophe, nous avons particulièrement étudié des gènes liés à la voie des jasmonates. L'implication de ces gènes dans le polymorphisme de résistance a été observée à deux niveaux : celui d'un différentiel d'expression, et celui d'un polymorphisme de séquences qui engendre une modification du produit du gène, le rendant plus ou moins efficace contre l'agent pathogène.

Sur la base de résultats préliminaires, nous avons montré une surexpression du gène *PR4* (activité chitinase potentielle) chez le génotype K3 suite à l'inoculation par *A. dauci*, comparativement aux autres génotypes étudiés (y compris le génotype I2). Il s'agit d'un résultat à confirmer (deux autres répétitions à analyser). Notre étude a porté sur un nombre très limité de gènes candidats, et à ce stade il est difficile d'affirmer que la voie de l'acide jasmonique est réellement impliquée dans la résistance de la carotte à *A. dauci*.

Sur la base des résultats obtenus dans le chapitre III (effet des extraits fongiques) et du chapitre IV (expression de gènes de défense), nous pouvons conclure que deux des génotypes utilisés dans cette étude, considérés comme partiellement résistants, diffèrent par le niveau d'implication de différents mécanismes de résistance : I2 résisterait mieux aux composés toxiques du champignon, tandis que chez K3, l'expression d'un gène de défense liée à la voie de l'acide jasmonique serait activée. À notre connaissance, nos travaux montrent pour la première fois, pour le pathosystème étudié, le lien entre une résistance aux toxines et une résistance partielle. Dans le cas de l'interaction entre la tomate et *Alternaria alternata* (production de la toxine AAL), il a été montré que la voie de l'AJ serait modulée par l'agent pathogène, afin que ce dernier puisse infecter la plante devenue sensible via cette modulation. La voie de l'AJ ne serait pas impliquée dans les défenses de la plante à la toxine fongique (Egusa *et al.*, 2009). Dans l'interaction carotte/*A. dauci*, la relation existant entre la résistance

de la plante aux composés toxiques du champignon et les défenses basées sur la voie de l'AJ reste à élucider. Pour cela, il serait intéressant d'analyser l'expression des gènes candidats étudiés au cours de la thèse (chapitre IV) dans des cellules végétales mises en contact avec les extraits fongiques. Des travaux de ce type ont été réalisés par Ramirez-Suero *et al.* (2012) sur des cals de *Vitis vinifera* traités par des filtrats extracellulaires des deux champignons pathogènes de la vigne. Des échantillons de cellules des différents génotypes traités avec les fractions toxiques du champignon, tels que ceux décrits dans le chapitre III, ont été collectés et sont conservés pour de futures analyses.

Concernant la deuxième partie du chapitre IV, ayant trait au polymorphisme de séquences des gènes de la voie de l'acide jasmonique, des SNPs ont été détectés sur deux des quatre gènes étudiés. Pour le gène PAL, les SNPs mis en évidence entre les génotypes ne modifient pas la séquence peptidique de la protéine codée par ce gène, ils n'ont donc pas d'effet sur cette protéine. En revanche pour le gène GLP, nous avons mis en évidence une séquence peptidique différente entre les génotypes K3 et H1 qui pourrait expliquer, au moins partiellement, le niveau de résistance de K3. Des investigations supplémentaires seraient nécessaires afin d'étudier de façon fine cette différence de protéine GLP entre les deux génotypes. Les gènes de la famille des GLP ont été mis en évidence dans des résistances partielles chez l'orge (Zimmermann *et al.*, 2006), le riz (Davidson *et al.*, 2009) et le colza (Rietz *et al.*, 2012). Ils colocalisent avec des QTLs de résistance (pour revue, Boyd *et al.*, 2013). Au sein de l'équipe QuaRVeg, les génotypes utilisés au cours de cette thèse correspondent à des parents de croisement pour l'obtention d'une carte génétique. La cartographie des gènes candidats étudiés pendant la thèse permettra de montrer s'il existe une colocalisation entre les QTLs de résistance à *A. dauci* (Le Clerc, com. pers.) et ces gènes candidats. Des marqueurs moléculaires correspondant aux SNPs mis en évidence seront prochainement testés sur les génotypes en ségrégation.

Dans le chapitre IV de cette thèse, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la résistance partielle de la carotte à *A. dauci* en analysant les profils d'expression ou le polymorphisme de séquences de quelques gènes candidats, potentiellement impliqués dans les défenses de la plante au champignon. Au démarrage de la thèse, il n'existait pas de données de séquençage concernant la carotte, obtenues par des approches globales. Depuis, le séquençage d'ESTs de la carotte a été réalisé et le transcriptome assemblé a été publié (Iorizzo *et al.*, 2011). Le séquençage du génome de la carotte est en cours d'achèvement (Briard, com. pers.). Ces nouvelles données génomiques pourraient être utilisées pour la recherche de polymorphisme de séquences et l'analyse de l'expression des gènes ciblés, en s'intéressant dans un premier temps aux gènes de défense liés à la voie de l'acide jasmonique afin de poursuivre l'exploration de cette voie en prolongement des travaux de thèse présentés ici. Nous pourrions ainsi avoir accès à un plus grand nombre de séquences issues du génome de la carotte et donc nous affranchir de l'utilisation d'amorces dégénérées et du clonage de gènes

candidats. À partir de ces séquences identifiées sur le génome, il sera possible de concevoir des amorces nous permettant l'analyse d'une séquence plus longue du gène voire de la séquence entière ; cette approche augmentera considérablement les chances de mettre en évidence du polymorphisme.

Parallèlement une analyse globale de l'expression de gènes via l'utilisation de microarrays pourrait être mise en œuvre afin de mettre en évidence les familles de gènes différentiellement exprimées dans un génotype partiellement résistant (tel que K3) et un génotype sensible (par ex. H1) en réponse à l'infection par *A. dauci*. De tels travaux ont été récemment menés par Jubault *et al.* (2013) dans le cadre de l'étude de la résistance partielle d'*A. thaliana* à *Plasmodiophora brassicae*, agent biotrophe responsable de la hernie des Brassicacées. Les résultats de cette étude mettent en évidence que la résistance partielle est liée à des modifications du métabolisme primaire de l'hôte et des processus de division et d'élongation cellulaire. Une approche du même type via l'utilisation de microarrays a été réalisée dans le cas de l'interaction du pommier avec la bactérie nécrogène *Erwinia amylovora* (Gaucher, 2012). Cette étude démontre notamment l'implication de la voie de l'AJ dans la résistance à cette bactérie. En termes de perspectives concernant nos travaux, une approche de type séquençage massif (RNAseq) pourrait également être proposée : il s'agirait de comparer les transcrits des génotypes K3 et I2 et un génotype sensible comme H1. Ces génotypes pourraient être confrontés à des souches d'*A. dauci* d'agressivité différente, en se basant sur l'étude de Boedo *et al.* (2012) qui met en évidence quatre niveaux d'agressivité chez cette espèce. De même que pour l'espèce carotte, très peu de séquences génomiques de l'agent pathogène *A. dauci* étaient disponibles dans les bases de données au début de la thèse. Le séquençage du transcriptome de ce champignon a été récemment réalisé au sein de l'équipe FungiSem de l'IRHS, en collaboration avec R. Berruyer. Ce transcriptome est en cours d'analyse. Les données de séquences obtenues dans ce cadre pourraient être exploitées, notamment pour rechercher des gènes de synthèse de toxines ; ceci en lien avec les travaux sur la caractérisation des fractions toxiques d'*A. dauci* menés en collaboration avec le laboratoire SONAS. Des travaux menés dans l'équipe FungiSem sur l'espèce *A. brassicicola*, agent du Black Spot des Brassicacées s'intéressent aux mécanismes de défense du champignon vis-à-vis de molécules de défense de la plante (Calmes, 2011 ; Joubert *et al.*, 2011). Pour réaliser ces travaux, l'équipe étudie le comportement de mutants d'*A. brassicicola* obtenus par transformation. Cette technique pourrait être appliquée à *A. dauci* afin de comparer des souches productrices de toxines de souches déficientes dans cette production. Ce matériel fongique pourra être utilisé dans de futures expériences visant à mieux comprendre les mécanismes de résistance partielle chez la carotte.



## Références bibliographiques

**ADAMUS A. ET MICHALIK B.** (2003). Anther cultures of carrot (*Daucus carota* L.). *Folia Horticulturae* **15**: 49-58.

**ADIE B. A. T., PEREZ-PEREZ J., PEREZ-PEREZ M. M., GODOY M., SANCHEZ-SERRANO J.-J., SCHMELZ E. A. ET SOLANO R.** (2007). ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **19**: 1665-1681.

**Agreste** [Internet]. Agreste : La statistique, l'évaluation et la prospective agricole - Fruits, légumes, viticulture, horticulture. Disponible sur : <<http://agreste.agriculture.gouv.fr/thematiques/productions-vegetales/fruits-legumes-viticulture>> (Consultation : mai 2012).

**AGRIOS G. N.** (2005). *Plant Pathology, 5th edition*. Elsevier Academic Press, 922 p.

**AHUJA I., KISSEN R. ET BONES A. M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* **17**: 73-90.

**AKAMATSU H., ITOH Y., KODAMA M., OTANI H. ET KOHMOTO K.** (1997). AAL-Toxin-Deficient Mutants of *Alternaria alternata* Tomato Pathotype by Restriction Enzyme-Mediated Integration. *Phytopathology* **87**: 967-972.

**ALASALVAR C., GRIGOR J. M., ZHANG D., QUANTICK P. C. ET SHAHIDI F.** (2001). Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 1410-1416.

**ALBAR L., LORIEUX M., AHMADI N., RIMBAULT I., PINEL A., SY A. A., FARGETTE D. ET GHESQUIÈRE A.** (1998). Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus. I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 1145-1154.

**ANDERSEN B., DONGO A. ET PRYOR B. M.** (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. *Mycological Research* **112**: 241-250.

**ANDERSEN S., CHRISTIANSEN I. ET FARESTVEIT B.** (1990). *In vitro* production of haploids and field trials. In : BAJAJ Y. (eds). *Haploids in Crop Improvement I*. Springer, Berlin, 393-402.

**ARUMUGANATHAN K. ET EARLE E.** (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**: 208-218.

**AUBERT S. ET BONNET A.** (1977). Intérêt alimentaire des Ombellifères - Exemple de la carotte. In : CAUWET-MARC A.-M. ET CARBONNIER J. (eds). *Les Ombellifères - Contributions pluridisciplinaires à la systématique*: 809-822. Actes du 2e symposium international sur les Ombellifères, 18 mai 1977, Perpignan, France.

- BAJAJ Y. P. S.** (1995). *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed*. Springer, 504 p.
- BALBI V. ET DEVOTO A.** (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist* **177**: 301–318.
- BALLARÉ C. L.** (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science* **16**: 249–257.
- BANGA O.** (1963). Origin and distribution of the western cultivated carrot. *Genetica Agraria* **17**: 357–370.
- BARANSKI R., KLOCKE E. ET SCHUMANN G.** (2006). Green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium rhizogenes* mediated carrot transformation. *Plant Cell Reports* **25**: 190–197.
- BARANSKI R., KLOCKE E. ET NOTHNAGEL T.** (2008). Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* **156**: 513–521.
- BARASH I., MOR H., NETZER D. ET KASHMAN Y.** (1981). Production of zinniol by *Alternaria dauci* and its phytotoxic effect on carrot. *Physiological Plant Pathology* **19**: 7–IN9.
- BARI R. ET JONES J.** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473–488.
- BARKAI-GOLAN R. ET PASTER N.** (2008). *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press, 407 p.
- BELKHADIR Y., SUBRAMANIAM R. ET DANGL J. L.** (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 391–399.
- BELL E., CREELMAN R. A. ET MULLET J. E.** (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 8675–8679.
- BEN-NOON E., SHTIENBERG D., SHLEVIN E., VINTAL H. ET DINOOR A.** (2001). Optimization of chemical suppression of *Alternaria dauci*, the causal agent of Alternaria leaf blight in carrots. *Plant disease* **85**: 1149–1156.
- BEN-NOON E., SHTIENBERG D., SHLEVIN E. ET DINOOR A.** (2003). Joint action of disease control measures: a case study of Alternaria leaf blight of carrot. *Phytopathology* **93**: 1320–1328.
- BENICHOUS S., DONGO A., HENNI D. E., PELTIER D. ET SIMONEAU P.** (2009). Isolation and characterization of microsatellite markers from the phytopathogenic fungus *Alternaria dauci*. *Molecular ecology resources* **9**: 390–392.
- BERESTETSKIY A. O.** (2008). A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology* **44**: 453–465.
- BERRUYER R., POUSSIER S., KANKANALA P., MOSQUERA G. ET VALENT B.** (2006). Quantitative and qualitative influence of inoculation methods on in planta growth of rice blast fungus. *Phytopathology* **96**: 346–355.
- BLANCARD D. ET DUBOURG C.** (2001). Brûlures foliaires de la carotte, alternariose ou cercosporiose? *Bulletin de la Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences* **159**: 21–24.

- BLANCHETTE M. L.** (2006). *The use of esterase activity as a measure of copper toxicity in marine microalgae*. Thèse de doctorat. James Cook University, 123 p.
- BOEDO C., BERRUYER R., LECOMTE M., BERSIHAND S., BRIARD M., LE CLERC V., SIMONEAU P. ET POUPARD P.** (2010). Evaluation of different methods for the characterization of carrot resistance to the alternaria leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*) revealed two qualitatively different resistances. *Plant Pathology* **59**: 368–375.
- BOEDO C., BENICHOUS S., BERRUYER R., BERSIHAND S., DONGO A., SIMONEAU P., LECOMTE M., BRIARD M., LE CLERC V. ET POUPARD P.** (2012). Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* in a controlled environment. *Plant Pathology* **61**: 63–75.
- BOEDO C., CLERC V., BRIARD M., SIMONEAU P., CHEVALIER M., GEORGEAULT S. ET POUPARD P.** (2008). Impact of carrot resistance on development of the *Alternaria* leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*). *European Journal of Plant Pathology* **121**: 55–66.
- BOEDO C.** (2009). *Déterminisme de l'interaction entre Alternaria dauci, agent de la brûlure foliaire de la carotte, et sa plante-hôte*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 172 p.
- BOITEUX L. S., DELLA VECCHIA P. T. ET REIFSCHNEIDER F. J. B.** (1993). Heritability Estimate for Resistance to *Alternaria dauci* in Carrot. *Plant Breeding* **110**: 165–167.
- BONAS U. ET LAHAYE T.** (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current opinion in microbiology* **5**: 44–50.
- BOYD L. A., RIDOUT C., O'SULLIVAN D. M., LEACH J. E. ET LEUNG H.** (2013). Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics* **29**: 233–240.
- BRANDWAGT B. F., MESBAH L. A., TAKKEN F. L. W., LAURENT P. L., KNEPPERS T. J. A., HILLE J. ET NIJKAMP H. J. J.** (2000). A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4961.
- BREEN J. ET BELLGARD M.** (2010). Germin-like proteins (GLPs) in cereal genomes: gene clustering and dynamic roles in plant defence. *Functional & Integrative Genomics* **10**: 463–476.
- BRIARD M., LE CLERC V., PELTIER D., SUEL A., GRANGER J., DUBOIS C. ET GEOFFRIAU E.** (2007). Genetic Resources Management with Networks: the Example of the Network « Carrot and Other Daucus ». *Acta Horticulturae* **760**: 99.
- BRODERSEN P., PETERSEN M., BJØRN NIELSEN H., ZHU S., NEWMAN M.-A., SHOKAT K. M., RIETZ S., PARKER J. ET MUNDY J.** (2006). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* **47**: 532–546.
- BRODNY U., NELSON R. R. ET GREGORY L. V.** (1986). The Residual and Interactive Expressions of « Defeated » Wheat Stem Rust Resistance Genes. *Phytopathology* **76**: 546.
- BROSCH G., RANSOM R., LECHNER T., WALTON J. D. ET LOIDL P.** (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *The Plant Cell Online* **7**: 1941–1950.
- BROWN R. L., KAZAN K., MCGRATH K. C., MACLEAN D. J. ET MANNERS J. M.** (2003). A Role for the GCC-Box in Jasmonate-Mediated Activation of the *PDF1.2* Gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**: 1020–1032.

- BROWSE J.** (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 183-205.
- BUELL C. R.** (1999). Genes involved in plant-pathogen interactions. In : AGRAWAL A. A., TUZUN S., ET BENT E. (eds). *Induced Plant Defenses Against Herbivores and Pathogens*. The American Phytopathological Society, St. Paul, 73-93.
- CALMES B.** (2011). *Réponses adaptatives d'Alternaria brassicicola au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées. Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, 125 p.
- CAO H., BOWLING S. A., GORDON A. S. ET DONG X.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell Online* **6**: 1583-1592.
- CAVAGNARO P. F., CHUNG S.-M., SZKLARCZYK M., GRZEBELUS D., SENALIK D., ATKINS A. E. ET SIMON P. W.** (2008). Characterization of a deep-coverage carrot (*Daucus carota* L.) BAC library and initial analysis of BAC-end sequences. *Molecular Genetics and Genomics* **281**: 273-288.
- CHAMPION R.** (1997). *Identifier les champignons transmis par les semences*. Éditions Quae, 405 p.
- CHAUX C. ET FOURY C.** (1994). *Productions légumières - Tome 2 : Légumes feuilles, tiges, fleurs, racines, bulbes*. Éditions Tec & Doc, Paris, 639 p.
- CHINI A., FONSECA S., FERNANDEZ G., ADIE B., CHICO J. M., LORENZO O., GARCIA-CASADO G., LOPEZ-VIDRIERO I., LOZANO F. M., PONCE M. R., MICOL J. L. ET SOLANO R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671.
- CLOTAULT J., PELTIER D., BERRUYER R., THOMAS M., BRIARD M. ET GEOFFRIAU E.** (2008). Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3563-3573.
- CLOTAULT J.** (2009). *Impact de la sélection sur l'expression et la variabilité de séquences de gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes chez la carotte cultivée*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 183 p.
- COLLINS A., MILBOURNE D., RAMSAY L., MEYER R., CHATOT-BALANDRAS C., OBERHAGEMANN P., JONG W. D., GEBHARDT C., BONNEL E. ET WAUGH R.** (1999). QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding* **5**: 387-398.
- COTTY P. J. ET MISAGHI I. J.** (1984). Zinniol Production by *Alternaria* Species. *Phytopathology* **74**: 785.
- COUTEUX A. ET LEJEUNE V.** (2011). *Index phytosanitaire ACTA 2012*. ACTA, Paris, 940 p.
- CUTLER S. R., RODRIGUEZ P. L., FINKELSTEIN R. R. ET ABRAMS S. R.** (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 651-679.
- DANGL J. L. ET JONES J. D. G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- DAVIDSON R. M., REEVES P. A., MANOSALVA P. M. ET LEACH J. E.** (2009). Germins: A diverse protein family important for crop improvement. *Plant Science* **177**: 499-510.

**DAVIES P. J.** (2004). The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. *In* : DAVIES P. J. (eds). *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Springer, 1-15.

**DELANEY T. P., FRIEDRICH L. ET RYALS J. A.** (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 6602-6606.

**DELLEDONNE M., XIA Y., DIXON R. A. ET LAMB C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.

**DESLANDES L. ET RIVAS S.** (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* **17**: 644-655.

**DIRKS R., SIDOROV V. ET TULMANS C.** (1996). A new protoplast culture system in *Daucus carota* L. and its applications for mutant selection and transformation. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **93**: 809-815.

**DONG X.** (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 547-552.

**DORE C. ET VAROQUAUX F.** (2006). *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Éditions Quae, 844 p.

**DOWNHAM A. ET COLLINS P.** (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology* **35**: 5-22.

**DOWNIE S. R. ET KATZ-DOWNIE D. S.** (1996). A Molecular Phylogeny of *Apiaceae* Subfamily Apioideae: Evidence from Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *American Journal of Botany* **83**: 234-251.

**DUGDALE L. J., MORTIMER A. M., ISAAC S., COLLIN H. A. ET OTHERS** (2000). Disease response of carrot and carrot somaclones to *Alternaria dauci*. *Plant pathology* **49**: 57-67.

**DUGE DE BERNONVILLE T.** (2009). *Caractérisations histologique, moléculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre Erwinia amylovora, agent du feu bactérien, et le pommier (Malus x domestica)*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 216 p.

**DUGE DE BERNONVILLE T., GAUCHER M., FLORS V., GAILLARD S., PAULIN J.-P., DAT J. F. ET BRISSET M.-N.** (2012). T3SS-dependent differential modulations of the jasmonic acid pathway in susceptible and resistant genotypes of *Malus* spp. challenged with *Erwinia amylovora*. *Plant Science* **188-189**: 1-9.

**e-PHY - Ministère de l'agriculture, de l'agro-alimentaire et de la forêt** [Internet]. e-PHY : Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France. Disponible sur : <<http://e-phy.agriculture.gouv.fr>> (Consultation : juin 2012).

**EGUSA M., OZAWA R., TAKABAYASHI J., OTANI H. ET KODAMA M.** (2009). The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen. *Planta* **229**: 965-976.

**EPPEL P., APEL K. ET BOHLMANN H.** (1995). An *Arabidopsis thaliana* Thionin Gene Is Inducible via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiology* **109**: 813-820.

**European Cultivated Potato Database** [Internet]. The European Cultivated Potato Database. Disponible sur : <<http://www.europotato.org/menu.php?>> (Consultation : juillet 2012).

- FAN X., MATTHEIS J. P. ET ROBERTS R. G.** (2000). Biosynthesis of phytoalexin in carrot root requires ethylene action. *Physiologia Plantarum* **110**: 450–454.
- FANCELLI M. I. ET KIMATI H.** (1991). Occurrence of iprodione resistant strains of *Alternaria dauci*. *Summa Phytopathologica* **17**: 135-146.
- FAOSTAT** [Internet]. Production de carotte au niveau mondial : tonnages et surfaces cultivées. Disponible sur : [http://faostat3.fao.org/home/index\\_fr.html?locale=fr#SEARCH\\_DATA](http://faostat3.fao.org/home/index_fr.html?locale=fr#SEARCH_DATA) (Consultation : mai 2012).
- FARMER E. E. ET RYAN C. A.** (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**: 7713-7716.
- FARMER E. E. ET RYAN C. A.** (1992). Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *The Plant Cell Online* **4**: 129-134.
- FARRAR J. J., PRYOR B. M. ET DAVIS R. M.** (2004). *Alternaria* diseases of carrot. *Plant disease* **88**: 776–784.
- FERREIRA R. B., MONTEIRO S., FREITAS R., SANTOS C. N., CHEN Z., BATISTA L. M., DUARTE J., BORGES A. ET TEIXEIRA A. R.** (2007). The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* **8**: 677–700.
- FEYS B., BENEDETTI C. E., PENFOLD C. N. ET TURNER J. G.** (1994). *Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *The Plant Cell Online* **6**: 751-759.
- FLORACK D. E. A. ET STIEKEMA W. J.** (1994). Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Molecular Biology* **26**: 25-37.
- FLORS V., TON J., VAN DOORN R., JAKAB G., GARCÍA-AGUSTÍN P. ET MAUCH-MANI B.** (2008). Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* **54**: 81–92.
- FONSECA S., CHINI A., HAMBERG M., ADIE B., PORZEL A., KRAMELL R., MIERSCH O., WASTERNAK C. ET SOLANO R.** (2009a). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nature Chemical Biology* **5**: 344-350.
- FONSECA S., CHICO J. M. ET SOLANO R.** (2009b). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 539-547.
- FranceAgriMer** [Internet]. Chiffres-clés des fruits et légumes (édition automne 2011). Disponible sur : <http://www.franceagrimer.fr/content/download/6897/39752/file/chiffres-cles-FL-2011.pdf> (Consultation : mai 2012).
- FUJIMOTO S. Y., OHTA M., USUI A., SHINSHI H. ET OHME-TAKAGI M.** (2000). *Arabidopsis* Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box–Mediated Gene Expression. *The Plant Cell Online* **12**: 393-404.
- FUKUOKA S., OKUNO K. ET KAWASE M.** (2007). Rice blast disease gene *Pi21*, resistance gene *pi21* and utilization thereof. *WO/2007/000880*, 05 janvier 2007.
- GAMBOA-ANGULO M. M., ALEJOS-GONZALEZ F., ESCALANTE-EROSA F., GARCIA-SOSA K., DELGADO-LAMAS G. ET PEÑA-RODRIGUEZ L. M.** (2000). Novel Dimeric Metabolites from *Alternaria tagetica*. *J. Nat. Prod.* **63**: 1117-1120.

- GAMBOA-ANGULO M. M., ESCALANTE-EROSA F., GARCIA-SOSA K., ALEJOS-GONZALEZ F., DELGADO-LAMAS G. ET PEÑA-RODRIGUEZ L. M.** (2002). Natural Zinniol Derivatives from *Alternaria tagetica*. Isolation, Synthesis, and Structure–Activity Correlation. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1053-1058.
- GAMBORG O. L., MURASHIGE T., THORPE T. A. ET VASIL I. K.** (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro* **12**: 473-478.
- GAMBORG O. L., MILLER R. A. ET OJIMA K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**: 151-158.
- GAO Z., EYERS S., THOMAS C., ELLIS N. ET MAULE A.** (2004). Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 488-494.
- GARROD B., LEA E. J. A. ET LEWIS B. G.** (1979). Studies on the mechanism of action of the antifungal compound faltarindiol. *New Phytologist* **83**: 463-471.
- GAUBE C., DUBOURG C., PAWELEC A., CHAMONT S., BLANCARD D. ET BRIARD M.** (2004). Brûlures foliaires parasitaires de la carotte : *Alternaria dauci* sous surveillance. *PHM Revue Horticole* **454**: 15-18.
- GAUCHER M.** (2012). *Identification par approches comparatives de facteurs moléculaires associés à la résistance ou à la sensibilité du Pommier (Malus x domestica) à Erwinia amylovora, agent du feu bactérien*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 145 p.
- GAUTHERET R.** (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences - Paris* **208**: 118-120.
- GEORGE E. F., HALL M. A. ET KLERK G.-J. D.** (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Springer, Dordrecht, 508 p.
- GLAZEBROOK J., ROGERS E. E. ET AUSUBEL F. M.** (1996). Isolation of *Arabidopsis* Mutants With Enhanced Disease Susceptibility by Direct Screening. *Genetics* **143**: 973-982.
- GLAZEBROOK J.** (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227.
- Gnis** [Internet]. Les chiffres clés du secteur semences. Disponible sur : <<http://www.gnis.fr/index/action/page/id/23/title/Les-chiffres-cles-du-secteur-semences>> (Consultation : juin 2012).
- GONNY M., BRADESI P. ET CASANOVA J.** (2004). Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal* **19**: 424-433.
- GÓRECKA K., KRZYŻANOWSKA D., KISZCZAK W. ET KOWALSKA U.** (2009). Plant regeneration from carrot (*Daucus carota* L.) anther culture derived embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**: 1139-1145.
- GÓRECKA K., KOWALSKA U., KRZYŻANOWSKA D. ET KISZCZAK W.** (2010). Obtaining carrot (*Daucus carota* L.) plants in isolated microspore cultures. *Journal of applied genetics* **51**: 141-147.
- GÓRECKA K., KRZYŻANOWSKA D. ET GÓRECKI R.** (2005). The influence of several factors on the efficiency of androgenesis in carrot. *Journal of applied genetics* **46**: 265-269.

- GRAYER R. J. ET KOKUBUN T.** (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* **56**: 253–263.
- GREEN V. S., STOTT D. E. ET DIACK M.** (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 693–701.
- GRIFFITH M. ET YAISH M. W. F.** (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* **9**: 399–405.
- GRZEBELUS E., SZKLARCZYK M. ET BARANSKI R.** (2012). An improved protocol for plant regeneration from leaf- and hypocotyl-derived protoplasts of carrot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **109**: 101–109.
- GULLAS I., KIRCHMAN P. A., CHUARD R., PFEFFERLI M., JIANG J. C., JAZWINSKI S. M. ET CONZELMANN A.** (2001). C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by *Lag1p* and *Lac1p*. *The EMBO Journal* **20**: 2655–2665.
- GUILLEMETTE T.** (2003). *Contribution à l'étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène d'Alternaria brassicae, l'agent du black spot des crucifères*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 195 p.
- GURURANI M. A., VENKATESH J., UPADHYAYA C. P., NOOKARAJU A., PANDEY S. K. ET PARK S. W.** (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**: 51–65.
- GUZZO F., BALDAN B., MARIANI P., SCHIAVO F. L. ET TERZI M.** (1994). Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1427–1432.
- GYOMLAI M.** (2010). *Etude de la résistance de la carotte cultivée (Daucus carota) au pathogène Alternaria dauci. Etude de l'effet de filtrats fongiques d'A. dauci sur des suspensions cellulaires de carotte*. Rapport de stage de Master 2 de Biologie Végétale Intégrative. Université d'Angers, Angers, 21 p.
- HAMAMA L.** (2002). *Éléments du déterminisme de l'orientation des cellules du sporophytes vers la voie de l'embryogenèse somatique chez le jojoba [Simmondsia chinensis (L.)]*. *Physiologie et contrôle moléculaire de la régénération*. Thèse de Doctorat d'État en Biologie. Université Cadi Ayyad, Marrakech, 262 p.
- HAMMERSCHMIDT R. ET SMITH-BECKER J. A.** (1999). The role of salicylic acid in disease resistance. In : AGRAWAL A. A., TUZUN S., ET BENT E. (eds). *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture*. The American Phytopathological Society, St. Paul, 37–53.
- HAMMERSCHMIDT R.** (2012). Secondary metabolites and defense: The story continues. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **80**: iii–iv.
- HARDEGGER M. ET STURM A.** (1998). Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular Breeding* **4**: 119–127.
- HARDING V. K. ET HEALE J. B.** (1980). Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology* **17**: 277–289.
- HATZIPAPAS P., KALOSAK K., DARA A. ET CHRISTIAS C.** (2002). Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycological Research* **106**: 1349–1359.

- HOISINGTON D. A., KHAIRALLAH M. ET GONZÁLEZ-DE-LEÓN D.** (1994). *Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. CIMMYT, Mexico.
- HOSSARD L., LANNOU C., PAPAIX J., MONOD H., LO-PEZLER E., SOUCHERE V. ET JEUFFROY M. H.** (2010). Quel déploiement spatio-temporel des variétés et des itinéraires techniques pour accroître la durabilité des résistances variétales ? *Innovations Agronomiques* **8**: 15-33.
- HUANG J., CARDOZA Y. J., SCHMELZ E. A., RAINA R., ENGELBERTH J. ET TUMLINSON J. H.** (2003). Differential volatile emissions and salicylic acid levels from tobacco plants in response to different strains of *Pseudomonas syringae*. *Planta* **217**: 767-775.
- HULLE M.** (1999). *Les Pucerons des plantes maraîchères: cycles biologiques et activités de vol*. Editions Quae, 140 p.
- Index Fungorum** [Internet]. The Index Fungorum, the global fungal nomenclator. Disponible sur : <<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>> (Consultation : juin 2012).
- INNES R. W.** (1996). Plant-pathogen interactions: unexpected findings on signal input and output. *The Plant Cell* **8**: 133.
- INNES R. W.** (2001). Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense. *Trends in Plant Science* **6**: 392-394.
- IORIZZO M., SENALIK D. A., GRZEBELUS D., BOWMAN M., CAVAGNARO P. F., MATVIENKO M., ASHRAFI H., VAN DEYNZE A. ET SIMON P. W.** (2011). De novo assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics* **12**: 389.
- JAYARAJ J. ET PUNJA Z. K.** (2007). Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Reports* **26**: 1539-1546.
- JENSEN A. B., RAVENTOS D. ET MUNDY J.** (2002). Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**: 595-606.
- JOHAL G. S. ET BRIGGS S. P.** (1992). Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science* **258**: 985-987.
- JOHNSON R.** (1981). Durable Resistance: Definition of, Genetic Control, and Attainment in Plant Breeding. *Phytopathology* **71**: 567.
- Joint Genome Institute** [Internet]. *Alternaria brassicicola* - Home. Disponible sur : <<http://genome.jgi-psf.org/Altbr1/Altbr1.home.html>> (Consultation : juin 2012).
- JONES J. D. G. ET DANGL J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- JONES M. J. ET DUNKLE L. D.** (1993). Analysis of *Cochliobolus carbonum* Races by PCR Amplification with Arbitrary and Gene-Specific Primers. *Phytopathology* **83**: 366-370.
- JOUBERT A., BATAILLE-SIMONEAU N., CAMPION C., GUILLEMETTE T., HUDHOMME P., IACOMI-VASILESCU B., LEROY T., POCHON S., POUPARD P. ET SIMONEAU P.** (2011). Cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways are required for adaptation of *Alternaria brassicicola* to cell wall stress caused by brassicaceous indolic phytoalexins. *Cellular microbiology* **13**: 62-80.
- JUBAULT M., LARIAGON C., TACONNAT L., RENOU J.-P., GRAVOT A., DELOURME R. ET MANZANARES-DAULEUX M. J.** (2013). Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based

on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Functional & Integrative Genomics* 1-15.

**KAMEYA T. ET UCHIMIYA H.** (1972). Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. *Planta* **103**: 356-360.

**KAZAN K. ET MANNERS J. M.** (2012). JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 22-31.

**KESARWANI M., YOO J. ET DONG X.** (2007). Genetic Interactions of TGA Transcription Factors in the Regulation of Pathogenesis-Related Genes and Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**: 336-346.

**KOCH E., SCHMITT A., STEPHAN D., KROMPHARDT C., JAHN M., KRAUTHAUSEN H.-J., FORSBERG G., WERNER S., AMEIN T., WRIGHT S., TINIVELLA F., GULLINO M., ROBERTS S., VAN DER WOLF J. ET GROOT S.** (2010). Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Alternaria dauci* and *A. radicina* on carrot seeds. *European Journal of Plant Pathology* **127**: 99-112.

**KOCH W., WAGNER C. ET SEITZ H. U.** (1998). Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta* **206**: 523-532.

**KOO A. J. K. ET HOWE G. A.** (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry* **70**: 1571-1580.

**KOUL P., KOUL A. K. ET HAMAL I. A.** (1989). Reproductive biology of wild and cultivated carrot (*Daucus carota* L.). *New Phytologist* **112**: 437-443.

**KUSABA M. ET TSUGE T.** (1995). Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Current Genetics* **28**: 491-498.

**LALOI C., APEL K. ET DANON A.** (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 323-328.

**LANGENBERG W. J., SUTTON J. C. ET GILLESPIE T. J.** (1977). Relation of weather variables and periodicities of airborne spores of *Alternaria dauci*. *Phytopathology* **67**: 879-883.

**LAUFER B.** (1919). The carrot. In : *Sino-Iranica: Chinese contributions to the History of civilization in Ancient Iran with special reference to the History of cultivated plants and products*. Field Museum of Natural History, Chicago, 451-454.

**Laurie-Berry N., Joardar V., Street I. H. ET Kunkel B. N.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 Gene Is Required for Suppression of Salicylic Acid-Dependent Defenses During Infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 789-800.

**LAWRIE J., DOWN V. M. ET GREAVES M. P.** (2000). Factors Influencing the Efficacy of the Potential Microbial Herbicide *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler on *Amaranthus retroflexus* (L.). *Biocontrol Science and Technology* **10**: 81-87.

**LAY F. T. ET ANDERSON M. A.** (2005). Defensins-components of the innate immune system in plants. *Current Protein and Peptide Science* **6**: 85-101.

**ŁAŻNIEWSKA J., MACIOSZEK V., LAWRENCE C. ET KONONOWICZ A.** (2010). Fight to the death: *Arabidopsis thaliana* defense response to fungal necrotrophic pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* **32**: 1-10.

**LE CLERC V.** (2001). *Etude de la diversité génétique chez la carotte (Daucus carota L.): mise au point de stratégies d'analyse et de régénération des ressources génétiques*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 125 p.

**LE CLERC V., PAWELEC A., BIROLLEAU-TOUCHARD C., SUEL A. ET BRIARD M.** (2009). Genetic architecture of factors underlying partial resistance to *Alternaria* leaf blight in carrot. *Theoretical and Applied Genetics* **118**: 1251-1259.

**LECOMTE M., ALENDA C., SEMENT F. M., BERTHET M., BRIARD M., POUPARD P. ET BERRUYER R.** (2011). Exploring plant defense pathways in the carrot-*Alternaria dauci* pathosystem, a non-model interaction. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* **76**: 587-590.

**LECOMTE M., HAMAMA L., BOEDO C., HUDHOMME P., BERSIHAND S., N'GUYEN G., BRIARD M., SIMONEAU P., LE CLERC V., POUPARD P. ET BERRUYER R.** (2012a). Effets inhibiteurs de la phytoalexine 6-méthoxymelléine sur le développement d'*Alternaria dauci*, agent de la brûlure foliaire de la carotte. In : Journées Jean Chevaugeon, 16 janvier 2012, Aussois, France.

**LECOMTE M., BERRUYER R., HAMAMA L., BOEDO C., HUDHOMME P., BERSIHAND S., ARUL J., N'GUYEN G., GATTO J., GUILLET D., RICHOMME P., SIMONEAU P., BRIARD M., LE CLERC V. ET POUPARD P.** (2012b). Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and faltarindiol on development of the fungal leaf blight pathogen *Alternaria dauci*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **80**: 58-67.

**LEHNINGER A. L.** (1994). *Principes de biochimie (Médecine sciences)*. Flammarion, Paris, 1035 p.

**LEPOIVRE P.** (2003). *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. De Boeck Université, Bruxelles, 430 p.

**LI J., BRADER G. ET PALVA E. T.** (2004a). The WRKY70 Transcription Factor: A Node of Convergence for Jasmonate-Mediated and Salicylate-Mediated Signals in Plant Defense. *The Plant Cell Online* **16**: 319-331.

**LI J., BRADER G., KARIOLA T. ET TAPIO PALVA E.** (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal* **46**: 477-491.

**LI L., ZHAO Y., MCCAIG B. C., WINGERD B. A., WANG J., WHALON M. E., PICHERSKY E. ET HOWE G. A.** (2004b). The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *The Plant Cell Online* **16**: 126-143.

**LI Z.-K., LUO L. J., MEI H. W., PATERSON A. H., ZHAO X. H., ZHONG D. B., WANG Y. P., YU X. Q., ZHU L., TABIEN R., STANSEL J. W. ET YING C. S.** (1999). A « defeated » rice resistance gene acts as a QTL against a virulent strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular and General Genetics MGG* **261**: 58-63.

**LIU J., LIU X., DAI L. ET WANG G.** (2007). Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *Journal of Genetics and Genomics* **34**: 765-776.

**LIU J.-J., STURROCK R. ET EKRAMODDOULLAH A.** (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports* **29**: 419-436.

**LOAKE G. ET GRANT M.** (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and

protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 466-472.

**LORENZO O., CHICO J. M., SÁNCHEZ-SERRANO J. J. ET SOLANO R.** (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate Between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **16**: 1938-1950.

**LORENZO O. ET SOLANO R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 532-540.

**LUDERER R., RIVAS S., NÜRNBERGER T., MATTEI B., VAN DEN HOOVEN H. W., VAN DER HOORN R. A. L., ROMEIS T., WEHRFRITZ J.-M., BLUME B., NENNSTIEL D., ZUIDEMA D., VERVOORT J., DE LORENZO G., JONES J. D. G., DE WIT P. J. G. M. ET JOOSTEN M. H. A. J.** (2001). No Evidence for Binding Between Resistance Gene Product Cf-9 of Tomato and Avirulence Gene Product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 867-876.

**LUND E. D. ET WHITE J. M.** (1990). Polyacetylenes in normal and waterstressed 'Orlando Gold' carrots (*Daucus carota*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **51**: 507-516.

**LYNGKJÆR M. F., NEWTON A. C., ATZEMA J. L. ET BAKER S. J.** (2000). The Barley *mlo*-gene: an important powdery mildew resistance source. *Agronomie* **20**: 745-756.

**MACKEVIC V. I.** (1929). The carrot of Afghanistan. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding* **20**: 517-562.

**MADDEN L. V., HUGHES G. ET VAN DEN BOSCH F.** (2007). *The study of plant disease epidemics*. American Phytopathological Society St. Paul, MN.

**MANOSALVA P. M., DAVIDSON R. M., LIU B., ZHU X., HULBERT S. H., LEUNG H. ET LEACH J. E.** (2009). A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiology* **149**: 286-296.

**MAO P., DUAN M., WEI C. ET LI Y.** (2007). WRKY62 Transcription Factor Acts Downstream of Cytosolic NPR1 and Negatively Regulates Jasmonate-Responsive Gene Expression. *Plant and Cell Physiology* **48**: 833-842.

**MARCHIVE C., LÉON C., KAPPEL C., COUTOS-THÉVENOT P., CORIO-COSTET M.-F., DELROT S. ET LAUVERGEAT V.** (2013). Over-Expression of VvWRKY1 in Grapevines Induces Expression of Jasmonic Acid Pathway-Related Genes and Confers Higher Tolerance to the Downy Mildew. *PLoS ONE* **8**: e54185.

**MARTIN G. B., BROMMONSCHENKEL S. H., CHUNWONGSE J., FRARY A., GANAL M. W., SPIVEY R., WU T., EARLE E. D. ET TANKSLEY S. D.** (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432-1436.

**MARTIN J. A. ET VOGEL E.** (1980). The synthesis of zinniol. *Tetrahedron* **36**: 791-794.

**MAUDE R. B., DREW R. L. K., GRAY D., PETCH G. M., BUJALSKI W. ET NIENOW A. W.** (1992). Strategies for control of seed-borne *Alternaria dauci* (leaf blight) of carrots in priming and process engineering systems. *Plant Pathology* **41**: 204-214.

**MCISAAC G., SANDERSON K. R., PETERS R. D., GARBARY D. ET ELLS A.** (2009). Impact of commercial foliage trimming on disease suppression and yield of processing carrots in Nova Scotia, Canada. *In* : 33rd International Carrot Conference, 18 janvier 2009, Anaheim, CA, USA.

**MCRBERTS N. ET LENNARD J. H.** (1996). Pathogen behaviour and plant cell reactions in

interactions between *Alternaria* species and leaves of host and nonhost plants. *Plant Pathology* **45**: 742–752.

**MELOTTO M., UNDERWOOD W., KOCZAN J., NOMURA K. ET HE S. Y.** (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **126**: 969–980.

**MERCIER J., ARUL J. ET JULIEN C.** (1993). Effect of UV-C on Phytoalexin Accumulation and Resistance to *Botrytis cinerea* in Stored Carrots. *Journal of Phytopathology* **139**: 17–25.

**MERCIER J. ET KUĆ J.** (1997). Elicitation of 6-Methoxymellein in Carrot Leaves by *Cercospora carotae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **73**: 60–62.

**MESSIAEN C.-M., BLANCARD D., ROUXEL F. ET LAFON R.** (1991). *Les Maladies des plantes maraîchères (Du labo au terrain)*. Éditions Quae, 576 p.

**MIAO Y. ET ZENTGRAF U.** (2007). The Antagonist Function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in Leaf Senescence Is Modulated by the Jasmonic and Salicylic Acid Equilibrium. *The Plant Cell Online* **19**: 819–830.

**Ministère de l'agriculture, de l'agro-alimentaire et de la forêt** [Internet]. Écophyto 2018. Disponible sur : <<http://agriculture.gouv.fr/ecophyto>> (Consultation : juillet 2012).

**MITSUHARA I., IWAI T., SEO S., YANAGAWA Y., KAWAHIGASI H., HIROSE S., OHKAWA Y. ET OHASHI Y.** (2008). Characteristic expression of twelve rice *PR1* family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics* **279**: 415–427.

**MITTLER R., VANDERAUWERA S., SUZUKI N., MILLER G., TOGNETTI V. B., VANDEPOELE K., GOLLERY M., SHULAEV V. ET VAN BREUSEGEM F.** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**: 300–309.

**MONTILLET J.-L.** (1986). *Dosage radioimmunologique du zinniol : application à l'étude de cette toxine dans l'alternariose de la carotte*. Thèse de doctorat. Paul Sabatier, Toulouse,

**MORDHORST A. P., TOONEN M. A. J., DE VRIES S. C. ET MEINKE D.** (1997). Plant Embryogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**: 535–576.

**MORRISSEY J. P. ET OSBOURN A. E.** (1999). Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 708–724.

**MOU Z., FAN W. ET DONG X.** (2003). Inducers of Plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell* **113**: 935–944.

**MUKHTAR M. S., NISHIMURA M. T. ET DANGL J.** (2009). NPR1 in Plant Defense: It's Not over « til It »s Turned over. *Cell* **137**: 804–806.

**MULTANI D. S., MEELEY R. B., PATERSON A. H., GRAY J., BRIGGS S. P. ET JOHAL G. S.** (1998). Plant–pathogen microevolution: Molecular basis for the origin of a fungal disease in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 1686–1691.

**MUR L. A. J., KENTON P., ATZORN R., MIERSCH O. ET WASTERACK C.** (2006). The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiology* **140**: 249–262.

**NASS H. A., PEDERSEN W. L., MACKENZIE D. R. ET NELSON R. R.** (1981). The Residual Effects of Some « Defeated » Powdery Mildew Resistance Genes in Isolines of Winter Wheat. *Phytopathology* **71**: 1315–1318.

- NDAMUKONG I., ABDALLAT A. A., THUROW C., FODE B., ZANDER M., WEIGEL R. ET GATZ C.** (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The Plant Journal* **50**: 128–139.
- NEHL D. ET BROWN J.** (2000). Biological control of the Noogoora burr complex with *Alternaria zinniae*: environmental conditions favouring disease. *Australasian Plant Pathology* **29**: 71–80.
- NICOLLE C., SIMON G., ROCK E., AMOUROUX P. ET RÉMÉSY C.** (2004). Genetic Variability Influences Carotenoid, Vitamin, Phenolic, and Mineral Content in White, Yellow, Purple, Orange, and Dark-Orange Carrot Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**: 523–529.
- NICOT N., HAUSMAN J.-F., HOFFMANN L. ET EVERS D.** (2005). Housekeeping Gene Selection for Real-Time RT-PCR Normalization in Potato During Biotic and Abiotic Stress. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2907–2914.
- NIKI T., MITSUHARA I., SEO S., OHTSUBO N. ET OHASHI Y.** (1998). Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. *Plant and Cell Physiology* **39**: 500–507.
- NIU Y., FIGUEROA P. ET BROWSE J.** (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2143–2154.
- NOBUTA K., OKRENT R. A., STOUTEMYER M., RODIBAUGH N., KEMPEMA L., WILDERMUTH M. C. ET INNES R. W.** (2007). The GH3 Acyl Adenylase Family Member PBS3 Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**: 1144–1156.
- OLSSON K. ET SVENSSON R.** (1996). The Influence of Polyacetylenes on the Susceptibility of Carrots to Storage Diseases. *Journal of Phytopathology* **144**: 441–447.
- OSTRY V.** (2008). *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin Journal* **1**: 175–188.
- OTANI H., KOHMOTO K. ET KODAMA M.** (1995). *Alternaria* toxins and their effects on host plants. *Canadian Journal of Botany* **73**: 453–458.
- PALLOIX A., Ayme V. ET MOURY B.** (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**: 190–199.
- PANDEY S. P. ET SOMSSICH I. E.** (2009). The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity. *Plant Physiology* **150**: 1648–1655.
- PARK J.-S., LEE K.-R., KIM J.-C., LIM S.-H., SEO J.-A. ET LEE Y.-W.** (1999). A Hemorrhagic Factor (Apicidin) Produced by Toxic *Fusarium* Isolates from Soybean Seeds. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 126–130.
- PAUWELS L., BARBERO G. F., GEERINCK J., TILLEMANS S., GRUNEWALD W., PÉREZ A. C., CHICO J. M., BOSSCHE R. V., SEWELL J., GIL E., GARCÍA-CASADO G., WITTERS E., INZÉ D., LONG J. A., DE JAEGER G., SOLANO R. ET GOOSSENS A.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788–791.
- PAWELEC A., DUBOURG C. ET BRIARD M.** (2006). Evaluation of carrot resistance to *alternaria*

leaf blight in controlled environments. *Plant pathology* **55**: 68–72.

**PAWELEC A.** (2005). *Caractérisation des déterminants génétiques et moléculaires de la résistance à Alternaria dauci chez la carotte*. Thèse de doctorat. Université d'Angers, Angers, 98 p.

**PEDERSEN W. L. ET LEATH S.** (1988). Pyramiding Major Genes for Resistance to Maintain Residual Effects. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 369-378.

**PENG X., HU Y., TANG X., ZHOU P., DENG X., WANG H. ET GUO Z.** (2012). Constitutive expression of rice WRKY30 gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Planta* **236**: 1485-1498.

**PENNINCKX I. A., EGGERMONT K., TERRAS F. R., THOMMA B. P., SAMBLANX G. W. D., BUCHALA A., METRAUX J. P., MANNERS J. M. ET BROEKAERT W. F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell Online* **8**: 2309-2323.

**PENNINCKX I. A. M. A., THOMMA B. P. H. J., BUCHALA A., MÉTRAUX J.-P. ET BROEKAERT W. F.** (1998). Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **10**: 2103-2113.

**PERON J.-Y.** (2006). *Références Productions légumières : 2ème édition*. Synthèse Agricole, 696 p.

**PETERSEN M., BRODERSEN P., NAESTED H., ANDREASSON E., LINDHART U., JOHANSEN B., NIELSEN H. B., LACY M., AUSTIN M. J., PARKER J. E., SHARMA S. B., KLESSIG D. F., MARTIENSSON R., MATSSON O., JENSEN A. B. ET MUNDY J.** (2000). *Arabidopsis* MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell* **103**: 1111-1120.

**PFAFFL M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45.

**PHAN C. T. ET HSU H.** (1973). Physical and chemical changes occurring in the carrot root during growth. *Canadian Journal of Plant Science* **53**: 629-634.

**PICKLE K. R.** (2009). *The Effects of Photo, Physical and Mechanical (PPM) Pre-treatments in Controlling Certain Pests and Diseases in Carrots, Daucus carota L. var. Sativus cv. Carson*. Thèse de doctorat. Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, 95 p.

**PITRAT M. ET FOURY C.** (2003). *Histoires de légumes : Des origines à l'orée du XXIe siècle*. Éditions Quae, 410 p.

**POISSONNIER J., REULET P., GUERY B. ET TISON P.** (1995). L'alternaria de la carotte. *Infos CTIFL* 42-45.

**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. *Trends in Plant Science* **14**: 21-29.

**PONTIER D., BALAGUE C. ET ROBY D.** (1998). The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **321**: 721-734.

**PRASAD P., DEVI P. S. ET REDDY M. N.** (1990). Studies on the early stages of infection of *Alternaria alternata* on groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Basic Microbiology* **30**: 349–352.

- Primer3Plus** [Internet]. Primer3Plus - pick primers from a DNA sequence. Disponible sur : <<http://primer3plus.com>> (Consultation : septembre 2012).
- PRYOR B. M., STRANDBERG J. O., DAVIS R. M., NUNEZ J. J. ET GILBERTSON R. L.** (2002). Survival and persistence of *Alternaria dauci* in carrot cropping systems. *Plant disease* **86**: 1115–1122.
- PUNJA Z. K.** (2005). Transgenic carrots expressing a thaumatin-like protein display enhanced resistance to several fungal pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* **27**: 291–296.
- QUI J. A., CASTRO-CONCHA L. A., GARCIA-SOSA K., MIRANDA-HAM M. L. ET PEÑA-RODRIGUEZ L. M.** (2010). Is zinniol a true phytotoxin? Evaluation of its activity at the cellular level against *Tagetes erecta*. *Journal of General Plant Pathology* **76**: 94–101.
- QUIRINO B. F., NOH Y.-S., HIMELBLAU E. ET AMASINO R. M.** (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**: 278–282.
- R Development Core Team** [Internet]. The R Project for Statistical Computing. Disponible sur : <<http://www.r-project.org>> (Consultation : mars 2011).
- RAMIREZ-SUERO M., CHONG J., FARINE S., KIEFFER-MAZET F., PENSEC F., GACOUNOLLE I., LEVA Y., LARIGNON P., KUNTZMANN P., ABOU-MANSOUR E., MAGNIN-ROBERT M., FONTAINE F. ET BERTSCH C.** (2012). Suivi de l'expression de gènes de défense après traitement de cals de *Vitis vinifera* par des filtrats extracellulaires de *Neofusicoccum parvum* et *Diplodia seriata*. In : Journées Jean Chevaugeon, 16 janvier 2012, Aussois, France.
- RAPILLY F.** (1991). *L'épidémiologie en pathologie végétale: mycoses aériennes*. Éditions Quae, 340 p.
- RAWAL H. C., SINGH N. K. ET SHARMA T. R.** (2013). Conservation, Divergence, and Genome-Wide Distribution of PAL and POX A Gene Families in Plants. *International Journal of Genomics* **2013**:
- REDURON J.-P.** (2007). *Ombellifères de France - tome 2 (Bulletin de la Société Botanique du Centre-Ouest, 27)*. Société Botanique du Centre-Ouest, 564 p.
- REINERT J.** (1958). Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften* **45**: 344–345.
- REYMOND P. ET FARMER E. E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current opinion in plant biology* **1**: 404–411.
- RIETZ S., BERNSDORFF F. E. M. ET CAI D.** (2012). Members of the germin-like protein family in *Brassica napus* are candidates for the initiation of an oxidative burst that impedes pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Experimental Botany* **63**: 5507–5519.
- ROTEM J.** (1994). *The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity*. APS Press, 344 p.
- ROY A. K.** (1969). Studies on leaf blight of carrot caused by *Alternaria dauci*. *Indian phytopathology* **22**: 105–109.
- RUBATZKY V. E., QUIROS C. F. ET SIMON P. W.** (1999). *Carrots and related vegetable Umbelliferae*. CABI, Wallingford, 310 p.
- SAMAC D. A., HIRONAKA C. M., YALLALY P. E. ET SHAH D. M.** (1990). Isolation and Characterization of the Genes Encoding Basic and Acidic Chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **93**: 907–914.

- SANTNER A. ET ESTELLE M.** (2007). The JAZ Proteins Link Jasmonate Perception with Transcriptional Changes. *The Plant Cell Online* **19**: 3839-3842.
- SANTOS P., NUNEZ J. J. ET DAVIS R. M.** (2000). Influence of gibberellic acid on carrot growth and severity of *Alternaria* leaf blight. *Plant disease* **84**: 555-558.
- SASAKI Y., ASAMIZU E., SHIBATA D., NAKAMURA Y., KANEKO T., AWAI K., AMAGAI M., KUWATA C., TSUGANE T., MASUDA T., SHIMADA H., TAKAMIYA K., OHTA H. ET TABATA S.** (2001). Monitoring of Methyl Jasmonate-responsive Genes in *Arabidopsis* by cDNA Macroarray: Self-activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways. *DNA Research* **8**: 153-161.
- SEO H. S., SONG J. T., CHEONG J.-J., LEE Y.-H., LEE Y.-W., HWANG I., LEE J. S. ET CHOI Y. D.** (2001a). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 4788-4793.
- SEO S., SETO H., YAMAKAWA H. ET OHASHI Y.** (2001b). Transient Accumulation of Jasmonic Acid During the Synchronized Hypersensitive Cell Death in *Tobacco mosaic virus* -Infected Tobacco Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 261-264.
- SHABANA Y. M., CHARUDATTAN R. ET ELWAKIL M. A.** (1995). Evaluation of *Alternaria eichhorniae* as a Bioherbicide for Waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Greenhouse Trials. *Biological Control* **5**: 136-144.
- SIMMONS E. G.** (1992). *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In : CHELKOWSKI J. ET VISCONTI A. (eds). *Alternaria : biology, plant diseases, and metabolites*. Elsevier, Amsterdam, 1-35.
- SIMMONS E. G.** (1995). *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon* **55**: 55-163.
- SIMON P. W. ET STRANDBERG J. O.** (1998). Diallel Analysis of Resistance in Carrot to *Alternaria* Leaf Blight. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **123**: 412-415.
- SIMON P. W., FREEMAN R. E., VIEIRA J. V., BOITEUX L. S., BRIARD M., NOTHNAGEL T., MICHALIK B. ET KWON Y.-S.** (2008). Carrot. In : PROHENS J. ET NUEZ F. (eds). *Vegetables II - Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*. Springer, New York, 327-357.
- SINDHU A., CHINTAMANANI S., BRANDT A. S., ZANIS M., SCOFIELD S. R. ET JOHAL G. S.** (2008). A guardian of grasses: Specific origin and conservation of a unique disease-resistance gene in the grass lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 1762-1767.
- SMALL E.** (1978). A numerical taxonomic analysis of the *Daucus carota* complex. *Canadian Journal of Botany* **56**: 248-276.
- SOLEL Z.** (1996). Iprodione Resistance of *Alternaria alternata* pv. *citri* from Minneola Tangelo in Israel and Florida. *Plant Disease* **80**: 291.
- SONG W.-Y., WANG G.-L., CHEN L.-L., KIM H.-S., PI L.-Y., HOLSTEN T., GARDNER J., WANG B., ZHAI W.-X., ZHU L.-H., FAUQUET C. ET RONALD P.** (1995). A Receptor Kinase-Like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804-1806.
- SOTEROS I. J.** (1979). Pathogenicity and control of *Alternaria radicina* and *A. dauci* in carrots. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **22**: 191-196.
- SOYLU S., KURT S., SOYLU E. M. ET TOK F. M.** (2005). First report of *alternaria* leaf blight caused by *Alternaria dauci* on carrot in Turkey. *Plant Pathology* **54**: 252-252.

- SPASSIEVA S. D., MARKHAM J. E. ET HILLE J.** (2002). The plant disease resistance gene Asc-1 prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *The Plant Journal* **32**: 561–572.
- SPETH E. B., LEE Y. N. ET HE S. Y.** (2007). Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 580–586.
- SPOEL S. H., KOORNNEEF A., CLAESSENS S. M. C., KORZELIUS J. P., VAN PELT J. A., MUELLER M. J., BUCHALA A. J., MÉTRAUX J.-P., BROWN R., KAZAN K., VAN LOON L. C., DONG X. ET PIETERSE C. M. J.** (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk Between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways Through a Novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell Online* **15**: 760–770.
- SPOEL S. H. ET DONG X.** (2008). Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses. *Cell Host & Microbe* **3**: 348–351.
- STÄDLER E. ET BUSER H.-R.** (1984). Defense chemicals in leaf surface wax synergistically stimulate oviposition by a phytophagous insect. *Experientia* **40**: 1157–1159.
- STANISZEWSKA M., KULA J., WIECZORKIEWICZ M. ET KUSEWICZ D.** (2005). Essential Oils of Wild and Cultivated Carrots—the Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Research* **17**: 579–583.
- STASKAWICZ B., AUSUBEL F., BAKER B., ELLIS J. ET JONES J.** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661–667.
- STASWICK P. E., YUEN G. Y. ET LEHMAN C. C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal* **15**: 747–754.
- STASWICK P. E. ET TIRYAKI I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**: 2117.
- STENZEL I., HAUSE B., MIERSCH O., KURZ T., MAUCHER H., WEICHERT H., ZIEGLER J., FEUSSNER I. ET WASTERNAK C.** (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **51**: 895–911.
- STEWART F. C., MAPES M. O. ET MEARS K.** (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* **705–708**.
- STEWART N., MARTIN R., ENGASSER J. M. ET GOERGEN J. L.** (1999). A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. *Plant Cell Reports* **19**: 171–176.
- STEWART H. E., BRADSHAW J. E. ET PANDE B.** (2003). The effect of the presence of R-genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) of potato (*Solanum tuberosum*) on the underlying level of field resistance. *Plant Pathology* **52**: 193–198.
- STRANDBERG J. O.** (1977). Spore Production and Dispersal of *Alternaria dauci*. *Phytopathology* **77**: 1262.
- STRANDBERG J. O.** (1983). Infection and Colonization of Inflorescences and Mericarps of Carrot by *Alternaria dauci*. *Plant Disease* **67**: 1351.
- STRANDBERG J. O.** (1984). Efficacy of Fungicides Against Persistence of *Alternaria dauci* on Carrot Seed. *Plant Disease* **68**: 39.
- STRANDBERG J. O.** (1988a). Detection of *Alternaria dauci* on Carrot Seed. *Plant Disease* **72**:

531.

**STRANDBERG J. O.** (1988b). Establishment of *Alternaria* Leaf Blight on Carrots in Controlled Environments. *Plant Disease* **72**: 522.

**STRANDBERG J. O. ET WHITE J. M.** (1989). Response of carrot seeds to heat treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **114**: 766 - 769.

**STRANDBERG J. O.** (1992). *Alternaria* species that attack vegetable crops: biology and options for disease management. In : CHELKOWSKI J. ET VISCONTI A. (eds). *Alternaria : biology, plant diseases, and metabolites*. Elsevier, Amsterdam, 175-208.

**STRAWN M. A., MARR S. K., INOUE K., INADA N., ZUBIETA C. ET WILDERMUTH M. C.** (2007). *Arabidopsis* Isochorismate Synthase Functional in Pathogen-induced Salicylate Biosynthesis Exhibits Properties Consistent with a Role in Diverse Stress Responses. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 5919-5933.

**SUGAWARA F. ET STROBEL G.** (1986). Zinniol, a phytotoxin, is produced by *Phoma macdonaldii*. *Plant science* **43**: 19-23.

**SUN T., SIMON P. W. ET TANUMIHARDJO S. A.** (2009). Antioxidant Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Biofortified Carrots (*Daucus carota* L.) of Various Colors. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 4142-4147.

**TAKAGI T., OYAMA M., ITOH H. ET SAKAI T.** (2007). A History of Japanese carrot cultivars. In : 32nd International Carrot Conference, 05 septembre 2007, Arcachon, France.

**TAKAICHI M. ET OEDA K.** (2000). Transgenic carrots with enhanced resistance against two major pathogens, *Erysiphe heraclei* and *Alternaria dauci*. *Plant Science* **153**: 135-144.

**THALER J., KARBAN R., ULLMAN D., BOEGE K. ET BOSTOCK R.** (2002). Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* **131**: 227-235.

**The Genome Institute** [Internet]. Genomes | *Alternaria brassicicola*. Disponible sur : <[http://genome.wustl.edu/genomes/view/alternaria\\_brassicicola](http://genome.wustl.edu/genomes/view/alternaria_brassicicola)> (Consultation : juin 2012).

**THEVISSSEN K., GHAZI A., SAMBLANX G. W. D., BROWNLEE C., OSBORN R. W. ET BROEKAERT W. F.** (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 15018-15025.

**THOMMA B. P. H. J.** (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* **4**: 225-236.

**THOMMA B. P., PENNINGCKX I. A., CAMMUE B. P. ET BROEKAERT W. F.** (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* **13**: 63-68.

**THULEAU P., GRAZIANA A., ROSSIGNOL M., KAUSS H., AURIOL P. ET RANJEVA R.** (1988). Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**: 5932.

**TIRILLY Y. ET BOURGEOIS C.-M.** (1999). *Technologie des légumes*. Éditions Tec & Doc, 558 p.

**TOONEN M. A. J., HENDRIKS T., SCHMIDT E. D. L., VERHOEVEN H. A., KAMMEN A. ET VRIES S. C.** (1994). Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* **194**: 565-572.

**TOYODA K., COLLINS N. C., TAKAHASHI A. ET SHIRASU K.** (2002). Resistance and

susceptibility of plants to fungal pathogens. *Transgenic research* **11**: 567–582.

**TRUMAN W., DE ZABALA M. T. ET GRANT M.** (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal* **46**: 14–33.

**TRUMAN W., BENNETT M. H., KUBIGSTELTIG I., TURNBULL C. ET GRANT M.** (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 1075-1080.

**TRUSOV Y., SEWELAM N., ROOKES J. E., KUNKEL M., NOWAK E., SCHENK P. M. ET BOTELLA J. R.** (2009). Heterotrimeric G proteins-mediated resistance to necrotrophic pathogens includes mechanisms independent of salicylic acid-, jasmonic acid/ethylene- and abscisic acid-mediated defense signaling. *The Plant Journal* **58**: 69–81.

**TURNBULL N.** (2009). *Mise au point de tests de viabilité appliqués à des cultures de suspensions cellulaires de Daucus carotta en vue de l'étude de la résistance à Alternaria dauci*. Rapport de stage de Master 1 de Biologie et Technologie du Végétal. Université d'Angers, Angers, 26 p.

**UNILET** [Internet]. Culture par culture - Carottes. Disponible sur : <<http://www.unilet.fr/cultures/carottes/carottes.php>> (Consultation : mai 2012).

**VAN LOON L. C., REP M. ET PIETERSE C. M. J.** (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162.

**VILLENEUVE F. ET LETEINTURIER J.** (1992a). *La carotte - Tome 2 : Etat des connaissances*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris, 227 p.

**VILLENEUVE F. ET LETEINTURIER J.** (1992b). *La carotte - Tome 1 : Guide pratique*. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes, Paris, 229 p.

**VINTAL H., BEN-NOON E., SHLEVIN E., YERMIYAHU U., SHTIENBERG D. ET DINOOR A.** (1999). Influence of rate of soil fertilization on alternaria leaf blight (*Alternaria dauci*) in carrots. *Phytoparasitica* **27**: 193-200.

**VITECEK J., PETRLOVA J., ADAM V., HAVEL L., KRAMER K. J., BABULA P. ET KIZEK R.** (2007). A fluorimetric sensor for detection of one living cell. *Sensors* **7**: 222–238.

**VIVEK B. S. ET SIMON P. W.** (1999). Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*). *Theoretical and Applied Genetics* **99**: 58-64.

**VOS P., SIMONS G., JESSE T., WIJBRANDI J., HEINEN L., HOGERS R., FRIJTERS A., GROENENDIJK J., DIERGAARDE P., REIJANS M., FIERENS-ONSTENK J., BOTH M. DE, PELEMAN J., LIHARSKAĎ T., HONTELEZ J. ET ZABEAUŠ M.** (1998). The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* **16**: 1365-1369.

**WAGNER G.** (2012). *Mécanismes sous-jacents aux résistances quantitatives à la hernie et au phoma chez le colza*. Thèse de doctorat. Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage, Rennes, 140 p.

**WALLY O. ET PUNJA Z. K.** (2010). Enhanced disease resistance in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants over-expressing a rice cationic peroxidase. *Planta* **232**: 1229-1239.

**WALLY O., JAYARAJ J. ET PUNJA Z. K.** (2009). Broad-spectrum disease resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens in transgenic carrots (*Daucus carota* L.) expressing an

- Arabidopsis* NPR1 gene. *Planta* **231**: 131-141.
- WALTON J. D.** (1996). Host-selective toxins: agents of compatibility. *The plant cell* **8**: 1723.
- WALTON J. D. ET PANACCIONE D. G.** (1993). Host-Selective Toxins and Disease Specificity: Perspectives and Progress. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 275-303.
- WALTON J. D.** (2006). HC-toxin. *Phytochemistry* **67**: 1406-1413.
- WALZ A., ZINGEN-SELL I., LOEFFLER M. ET SAUER M.** (2008). Expression of an oxalate oxidase gene in tomato and severity of disease caused by *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* **57**: 453-458.
- WANG H., LI J., BOSTOCK R. M. ET GILCHRIST D. G.** (1996). Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development. *The Plant Cell Online* **8**: 375-391.
- WANG Z., TARMINO G., YANG D., LIU G., TINGEY S. V., MIAO G.-H. ET WANG G.-L.** (2001). Rice ESTs with disease-resistance gene- or defense-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. *Molecular Genetics and Genomics* **265**: 302-310.
- WASTERNAK C.** (2007). Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* **100**: 681-697.
- WHITE G. A. ET STARRATT A. N.** (1967). The production of a phytotoxic substance by *Alternaria zinniae*. *Canadian Journal of Botany* **45**: 2087-2090.
- WIGHT W. D., KIM K.-H., LAWRENCE C. B. ET WALTON J. D.** (2009). Biosynthesis and Role in Virulence of the Histone Deacetylase Inhibitor Depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1258-1267.
- WIRTHMUELLER L., ZHANG Y., JONES J. D. G. ET PARKER J. E.** (2007). Nuclear Accumulation of the *Arabidopsis* Immune Receptor RPS4 Is Necessary for Triggering EDS1-Dependent Defense. *Current Biology* **17**: 2023-2029.
- WISSER R. J., SUN Q., HULBERT S. H., KRESOVICH S. ET NELSON R. J.** (2005). Identification and Characterization of Regions of the Rice Genome Associated With Broad-Spectrum, Quantitative Disease Resistance. *Genetics* **169**: 2277-2293.
- WU Y., ZHANG D., CHU J. Y., BOYLE P., WANG Y., BRINDLE I. D., DE LUCA V. ET DESPRÉS C.** (2012). The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* **1**: 639-647.
- WULFF B. B. H., CHAKRABARTI A. ET JONES D. A.** (2009). Recognition Specificity and Evolution in the Tomato-*Cladosporium fulvum* Pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1191-1202.
- XIE D.-X., FEYS B. F., JAMES S., NIETO-ROSTRO M. ET TURNER J. G.** (1998). COI1: An *Arabidopsis* Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science* **280**: 1091-1094.
- YAMAMOTO S., SUZUKI K. ET SHINSHI H.** (1999). Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *The Plant Journal* **20**: 571-579.
- YU S. H., NISHIMURA S. ET FURUICHI N.** (1983). Production of zinniol by *Alternaria porri*

and its phytotoxicity. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **49**: 746-748.

**ZAREI A., KÖRBES A., YOUNESSI P., MONTIEL G., CHAMPION A. ET MEMELINK J.** (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **75**: 321-331.

**ZENBAYASHI-SAWATA K., FUKUOKA S., KATAGIRI S., FUJISAWA M., MATSUMOTO T., ASHIZAWA T. ET KOIZUMI S.** (2007). Genetic and Physical Mapping of the Partial Resistance Gene, *Pi34*, to Blast in Rice. *Phytopathology* **97**: 598-602.

**ZHENG Z., QAMAR S. A., CHEN Z. ET MENGISTE T.** (2006). *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* **48**: 592-605.

**ZHU Q., DABI T., BEECHE A., YAMAMOTO R., LAWTON M. A. ET LAMB C.** (1995). Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Molecular Biology* **29**: 535-550.

**ZIEGLER J., STENZEL I., HAUSE B., MAUCHER H., HAMBERG M., GRIMM R., GANAL M. ET WASTERACK C.** (2000). Molecular Cloning of Allene Oxide Cyclase THE ENZYME ESTABLISHING THE STEREOCHEMISTRY OF OCTADECANOIDS AND JASMONATES. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 19132-19138.

**ZIMMERMANN G., BÄUMLEIN H., MOCK H.-P., HIMMELBACH A. ET SCHWEIZER P.** (2006). The Multigene Family Encoding Germin-Like Proteins of Barley. Regulation and Function in Basal Host Resistance. *Plant Physiology* **142**: 181-192.

**ZIPFEL C., ROBATZEK S., NAVARRO L., OAKELEY E. J., JONES J. D. G., FELIX G. ET BOLLER T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**: 764-767.

## Annexes

- **Annexe 1** : Composition du milieu liquide de base Gamborg ..... 184
- **Annexe 2** : Gammes étalon de la Fluorescéine et du réactif de Bradford ..... 185
- **Annexe 3** : Code génétique des acides aminés et code dégénéré des nucléotides..... 186
- **Annexe 4** : Amorces dégénérées utilisées..... 188
- **Annexe 5** : Détermination de l'efficacité d'amplification des amorces utilisées en qPCR ..... 190
- **Annexe 6** : Analyse statistique via le logiciel R : modèle linéaire du niveau d'expression ..... 191
- **Annexe 7** : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées ... 194
- **Annexe 8** : Éditorial de PMPP (octobre 2012) par Hammerschmidt ..... 209
- **Annexe 9** : Poster présenté aux JJC2012, 16-20 janvier 2012, Aussois, France ..... 211
- **Annexe 10** : Extended abstrat publié suite au 63rd ISCP, 24 mai 2011, Ghent, Belgique ..... 212
- **Annexe 11** : Listes des travaux et publications..... 216

## Annexe 1 : Composition du milieu liquide de base Gamborg

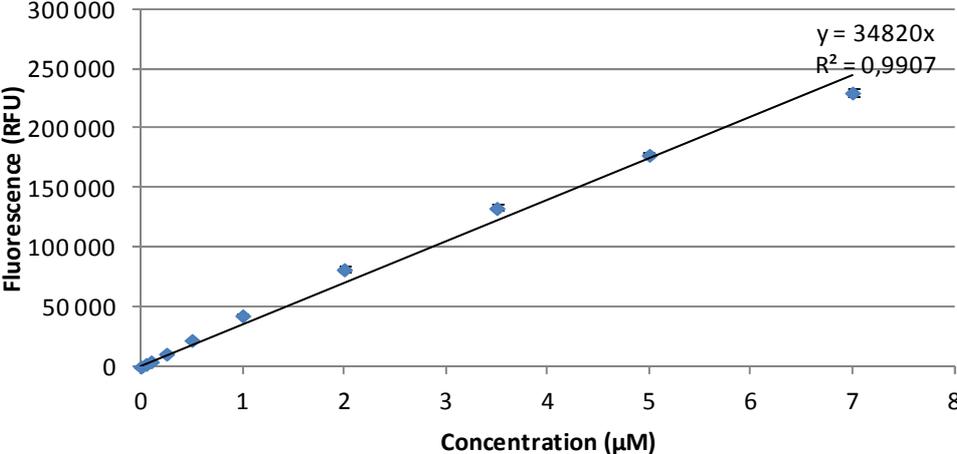
Composés		Concentration massique dans la solution mère (g.L <sup>-1</sup> )	Volume par litre de milieu (mL)	Concentration massique dans le milieu (mg.L <sup>-1</sup> )
Macroéléments	KNO <sub>3</sub>	25	20	500
	CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,5		30
	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2,5		50
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,34		26,8
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	1,5		30
Microéléments	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	1	3
	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	10,0		10
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2		2
	KI	0,75		0,75
	CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025		0,025
	CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025		0,025
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,250		0,25
Fe-EDTA	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	5,57	5	27,85
	Na <sub>2</sub> -EDTA	7,45		37,25
Vitamines	Acide nicotinique	0,5	1	0,5
	Chlorhydrate de thiamine	5		5
	Chlorhydrate de pyridoxal	0,5		0,5
	Myo-inositol	100		100
Saccharose				30.10 <sup>3</sup>
Eau distillée			qsp 1L	

pH ajusté à 5,8 par ajout de NaOH ou HCl

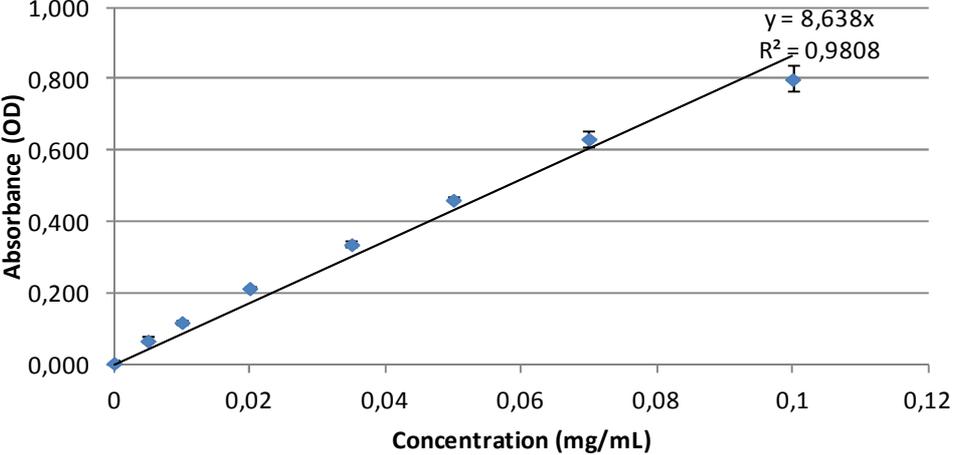
→ Pour un milieu solide, ajouter 7 g.L<sup>-1</sup> de gélose

Annexe 2 : Gammes étalon de la Fluorescéine et du réactif de Bradford

**Fluorescéine**



**Bradford**



### Annexe 3 : Code génétique des acides aminés et code dégénéré des nucléotides

*Code génétique des acides aminés.*

<b>Symbole</b>	<b>Code 3c</b>	<b>AA</b>	<b>Codons</b>	<b>Codons dégénérés</b>
<b>A</b>	Ala	Alanine	GCT, GCC, GCA, GCG	GCN
<b>C</b>	Cys	Cystéine	TGT, TGC	TGY
<b>D</b>	Asp	Acide aspartique	GAT, GAC	GAY
<b>E</b>	Glu	Acide glutamique	GAA, GAG	GAR
<b>F</b>	Phe	Phénylalanine	TTT, TTC	TTY
<b>G</b>	Gly	Glycine	GGT, GGC, GGA, GGG	GGN
<b>H</b>	His	Histidine	CAT, CAC	CAY
<b>I</b>	Ile	Isoleucine	ATT, ATC, ATA	ATH
<b>K</b>	Lys	Lysine	AAA, AAG	AAR
<b>L</b>	Leu	Leucine	TTG, TTA CTT, CTC, CTA, CTG	TTN + CTR
<b>M</b>	Met	Méthionine	ATG	ATG
<b>N</b>	Asn	Asparagine	AAT, AAC	AAV
<b>P</b>	Pro	Proline	CCT, CCC, CCA, CCG	CCN
<b>Q</b>	Gln	Glutamine	CAA, CAG	CAR
<b>R</b>	Arg	Arginine	CGT, CGC, CGA, CGG AGA, AGG	CGN + AGR
<b>S</b>	Ser	Sérine	TCT, TCC, TCA, TCG AGT, AGC	TCN + AGY
<b>T</b>	Thr	Thréonine	ACT, ACC, ACA, ACG	ACN
<b>V</b>	Val	Valine	GTT, GTC, GTA, GTG	GTN
<b>W</b>	Trp	Tryptophane	TGG	TGG
<b>X</b>	Xxx	Inconnu	-	
<b>Y</b>	Tyr	Tyrosine	TAT, TAC	TAY
<b>*</b>	End	Stop	TAA, TAG, TGA	TAR + TGA

### Annexe 3 : Code génétique des acides aminés et code dégénéré des nucléotides

*Code dégénéré des nucléotides.*

<b>IUB/GCG</b>	<b>Base</b>	<b>Complément</b>
<b>A</b>	A	T
<b>C</b>	C	G
<b>G</b>	G	C
<b>T/U</b>	T	A
<b>M</b>	A ou C	K
<b>R</b>	A ou G	Y
<b>W</b>	A ou T	W
<b>S</b>	C ou G	S
<b>Y</b>	C ou T	R
<b>K</b>	G ou T	M
<b>V</b>	A ou C ou G	B
<b>H</b>	A ou C ou T	D
<b>D</b>	A ou G ou T	H
<b>B</b>	C ou G ou T	V
<b>X/N</b>	G ou A ou T ou C	X
.	ni G ni A ni T ni C	.

## Annexe 4 : Amorces dégénérées utilisées

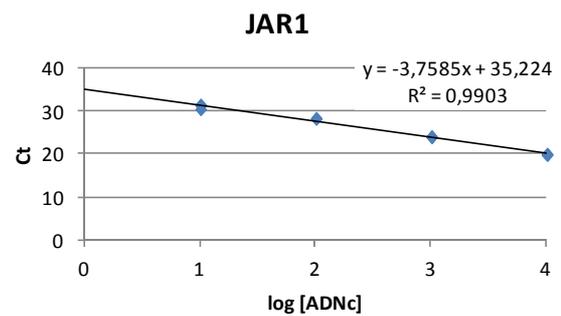
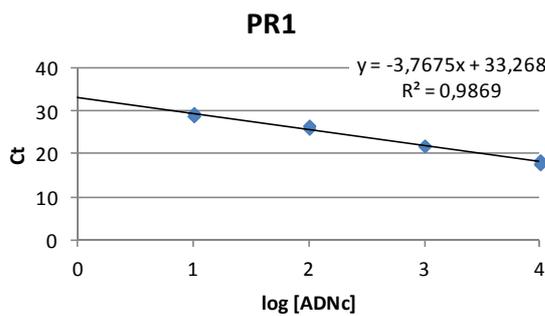
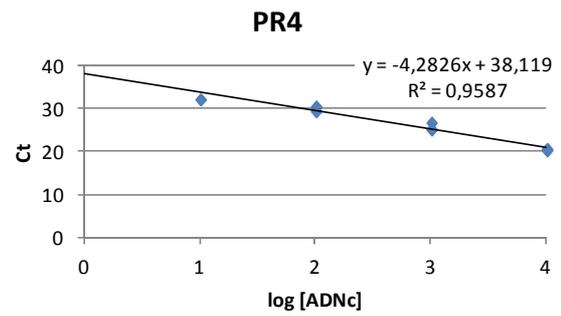
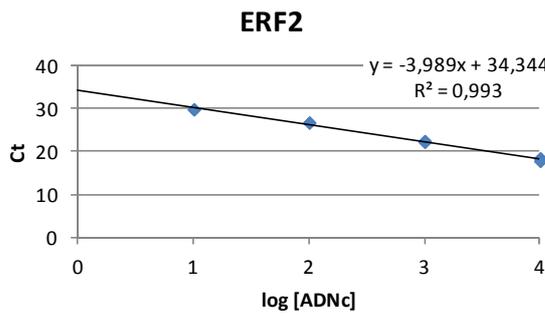
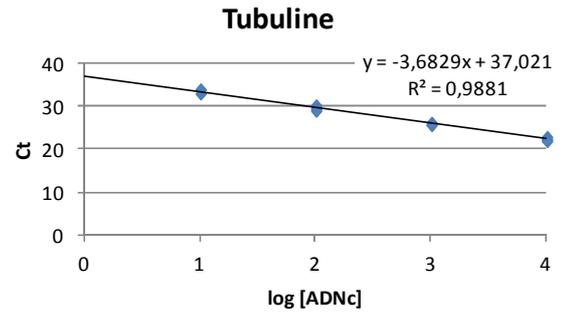
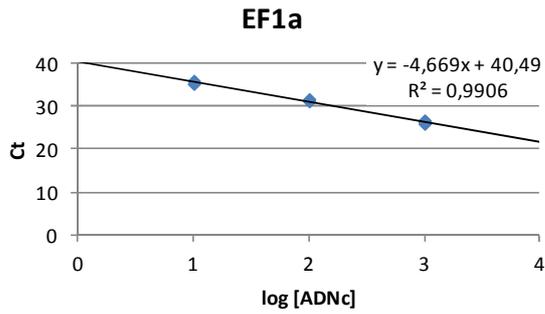
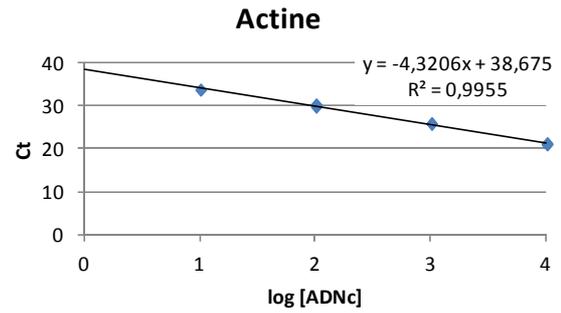
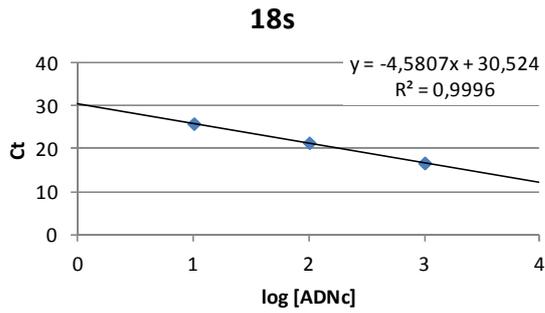
*Amorces dégénérées utilisées. Légendes : RBxxF : amorce forward ; RBxxR : amorce reverse.*

Nom	Gène cible	Longueur (pb)	Séquence 5'-3'
RB44F	LOX2	20	GAYTAYCCITWYGCNAACGA
RB45F	LOX2	20	GAYTAYCCITWYGCNAATGA
RB44R	LOX2	20	TAYTGICCRAARTTIACNGC
RB45R	LOX2	20	TAYTGICCRAARTTIAANGC
RB46R	LOX2	20	TAYTGICCRAARTTYAGNGC
RB96F	LOX2	23	TAYGAYTAYGAYRTITAYAACGA
RB97F	LOX2	23	TAYGAYTAYGAYRTITAYAATGA
RB96R	LOX2	22	GCRTT DATYTCCATIGTRTAYC
RB97R	LOX2	22	GCRTT DATYTCCATIGTRTARC
RB98F	LOX2	23	AARCCICARTGGAARGARGTNTT
RB99F	LOX2	23	AARCCICARTGGAARCARGTNTT
RB98R	LOX2	23	AAIACYTSYTTCCAYTGNGGCTT
RB99R	LOX2	23	AAIACYTSYTTCCAYTGNGGTTT
RB110F	AOS	23	CTITTYACNGGIACNTTCATGCC
RB111F	AOS	23	CTITTYACNGGIACNTTTATGCC
RB112F	AOS	23	TTRTTYACIGGNACITTYATGCC
RB110R	AOS	23	TCYTTICCNGCRCAYTGYTTATT
RB111R	AOS	23	TCYTTICCNGCRCAYTGYTTGTT
RB119F	AOC	23	TTYTAYTTYGGIGAYTAYGGYCA
RB120F	AOC	23	TTYTAYTTYGGIGAYTAYGGRCA
RB119R	AOC	23	CCYTTIAGRTARAAIGTRTARAA
RB120R	AOC	23	CCYTTYAARTARAAIGTRTARAA
RB47F	JAR1	22	ACITTYGARSARGTITGGGAAG
RB47R	JAR1	23	GGYTCCATISWICCI GTCATAAT
RB48F	JAR1	22	ACITTYGARSARGTITGGGAGG
RB48R	JAR1	23	GGYTCCATISWICCI GTCATCAT
RB49R	JAR1	23	GGYTCCATISWICCI GTCATTAT
RB51R	JAR1	23	TCIGTRTTYTTRTCHATRTTCAT
RB52R	JAR1	23	TCIGTRTTYTTRTCHATRTTTAT
RB53F	COI1	23	AARITIGAI AARTGYTCNGGNTT
RB54F	COI1	23	AARITIGAI AARTGYAGYGGNTT
RB53R	COI1	22	CITCITCRTCYTCCATNYCTTG
RB54R	COI1	22	CITCITCRTCYTCCATNYCCTG
RB55F	JAZ3	20	ATGGARMGIGAYTTYTTNGG
RB56F	JAZ3	20	ATGGARMGIGAYTTYMTRGG
RB55R	JAZ3	22	CIGCRTARAADATIGTNARCTG
RB56R	JAZ3	22	CIGCRTARAADATIGTNARTTG
RB104F	JAZ3	23	CARAARGCICAAGCIATHATGTT
RB105F	JAZ3	23	CARAARGCICAGGCIATHATGTT
RB104R	JAZ3	22	CYTTICGIGCYTGIGGNACRGC
RB105F	JAZ3	22	CYTTICGIGCYTGIGGNACYGC
RB106R	JAZ3	22	CYTTYCTIGCYTGIGGNACRGC
RB107R	JAZ3	22	CYTTYCTIGCYTGIGGNACYGC
RB57F	MYC2	23	TGGACITAYGCIATHTTYTGCCA
RB57R	MYC2	23	AACCAITCIGTRTCNGTNACCTC
RB58R	MYC2	23	AACCAITCIGTRTCNGTNACTTC
RB113F	NINJA	23	ACIGCIGARAAYGARGAYGTRGC
RB114F	NINJA	23	ACIGCIGARAAYGARGAYGTYGC

## Annexe 4 : Amorces dégénérées utilisées

Nom	Gène cible	Longueur (pb)	Séquence 5'-3'
RB113R	NINJA	23	TGIACNNGGIGARTANCCRAACAT
RB114R	NINJA	23	TGIACIGGRCTRANCCRAACAT
RB102F	MPK4	23	AARATHGGIAAYGCIGARGACAA
RB103F	MPK4	23	AARATHGGIAAYGCIGARGATAA
RB102R	MPK4	23	ACIACRTARAANGTCATRAAATC
RB103R	MPK4	23	ACIACRTARAANGTCATRAAGTC
RB66F	CHI-B	21	CAIGARACIACIGGNGGSTGG
RB67F	CHI-B	21	CAIGARACIACIGGNGGWTGG
RB66R	CHI-B	23	TCIARICCCCRTTDATDATATT
RB67R	CHI-B	23	TCIARICCCCRTTDATDATATT
RB70R	PR4-HEL	23	CCICCRTTIGARCAITGRTCAC
RB71R	PR4-HEL	23	CCICCRTTRCTRCAITGRTCAC
RB71F	PR4-HEL	23	GCITAITGYTCIACNTGGGAYGC
RB72F	PR4-HEL	23	GCITAITGYAGYACNTGGGAYGC
RB100F	PR4-HEL	23	AARTAYGGITGGACIGCNTTATG
RB101F	PR4-HEL	23	AARTAYGGITGGACIGCNTTGTG
RB100R	PR4-HEL	23	CCRCARTTIACRAAYTGRTAATT
RB101R	PR4-HEL	23	CCRCARTTIACRAAYTGRTAGTT
RB115F	PR5-TLP	23	GTITCNCTIGTNGAYGGITAYAA
RB116F	PR5-TLP	23	GTIAGYCTIGTNGAYGGITAYAA
RB117F	PR5-TLP	23	GTIAGYTTRGTIGAYGGNTAYAA
RB118F	PR5-TLP	23	GTITCNTTRGTIGAYGGNTAYAA
RB115R	PR5-TLP	23	TCRTCRTAIGCRTAIGARTARGC
RB116R	PR5-TLP	23	TCRTCRTAIGCRTAIGARTAYGC
RB117R	PR5-TLP	23	TCRTCRTAIGCRTARCTRARGC
RB118R	PR5-TLP	23	TCRTCRTAIGCRTARCTRAYGC
RB72R	PDF1.2	23	GCICCRTGIGCIGCNCCYTCCCA
RB73F	PDF1.2	24	TGIGARAARCCITCIAARACNTGG
RB74F	PDF1.2	24	TGIGARAARCCIAGYAARACWTGG
RB75F	PDF1.2	24	TGIGARAARCCIAGYAARACSTGG
RB68F	GLP	23	CCITTICARGAITTYTGyGTNGC
RB69F	GLP	23	CCICTRCARGAITTYTGCGTNGC
RB70F	GLP	23	CCICTRCARGAITTYTGTGTNGC
RB68R	GLP	23	CGIGGRTGIGTRTGIGGNGGRTT
RB69R	GLP	23	CTIGGRTGIGTRTGIGGNGGRTT
RB81R	PAL	20	CCIAARCARGAICGNTAYGC
RB82F	PAL	23	AARCCIAARCARGAIAGRAYGC
RB82R	PAL	23	ARITCIGARAAITGNGCRAACAT
RB83R	PAL	23	ARITCRCTRAAITGIGCRAACAT
RB76F	PR1	23	TCIGGIGGICITAYGGNGARAA
RB77F	PR1	23	AGYGGIGGICITAYGGNGARAA
RB76R	PR1	24	IACIACYTGIGTRTARTGNCCACA
RB77R	PR1	24	IACIACYTGIGTRTARTGNCCGCA
RB108F	ERF2	24	AARGARAAYGAYTCIGARGACATG
RB109F	ERF2	24	AARGARAAYGAYTCIGARGATATG
RB108R	ERF2	23	ATYTCIGCIGCRAAYTTMCCCCA
RB109R	ERF2	23	ATYTCIGCIGCRAAYTTKCCCCA

Annexe 5 : Détermination de l'efficacité d'amplification des amorces utilisées en qPCR.



## Annexe 6 : Analyse statistique via le logiciel R : modèle linéaire du niveau d'expression

```
> Dataset <- read.table("clipboard", header=TRUE, sep="\t", na.strings="NA",
dec=".", strip.white=TRUE)

> fix(Dataset)

> LinearModel.1 <- lm(PR4 ~ Traitement, data=Dataset)

> summary(LinearModel.1)

Call:
lm(formula = PR4 ~ Traitement, data = Dataset)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.9395 -0.2421 -0.1045  0.2702  0.8080

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)   -0.7928     0.1885  -4.205 0.000436 ***
Traitement[T.j7] -0.7928     0.2666  -2.973 0.007518 **
Traitement[T.j9] -0.3826     0.2666  -1.435 0.166737
Traitement[T.T-] -0.8116     0.2666  -3.044 0.006412 **
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.4618 on 20 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.3858,    Adjusted R-squared:  0.2936
F-statistic: 4.187 on 3 and 20 DF,  p-value: 0.01877

> library(multcomp, pos=4)

> library(abind, pos=4)

> AnovaModel.2 <- aov(PR4 ~ Traitement, data=Dataset)

> summary(AnovaModel.2)
            Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Traitement  3  2.679  0.8931   4.187 0.0188 *
Residuals  20  4.266  0.2133
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> numSummary(Dataset$PR4 , groups=Dataset$Traitement, statistics=c("mean", "sd"))
      mean      sd data:n
j13 -0.7927989 0.4770678     6
j7  -1.5855556 0.5957025     6
j9  -1.1754444 0.4676465     6
T-  -1.6043914 0.2281937     6

> waller.test(Dataset$PR4, Dataset$Traitement, 20, 0.2133, 4.187)

Study:

Waller-Duncan K-ratio t Test for Dataset$PR4

This test minimizes the Bayes risk under additive
loss and certain other assumptions.

      . . . . .
K ratio                100.0000
Error Degrees of Freedom 20.0000
Error Mean Square        0.2133
F value                  4.1870
Critical Value of Waller 2.1900

Dataset$Traitement, means
```

## Annexe 6 : Analyse statistique via le logiciel R : modèle linéaire du niveau d'expression

	Dataset.PR4	std.err	r	Min.	Max.
j13	-0.7927989	0.19476210	6	-1.234460	-0.0799141
j7	-1.5855556	0.24319453	6	-2.525060	-0.8072966
j9	-1.1754444	0.19091589	6	-1.602104	-0.3674360
T-	-1.6043914	0.09315969	6	-1.874848	-1.3009806

Minimum Significant Difference 0.5839544  
Means with the same letter are not significantly different.

Comparison of treatments

Groups,	Treatments	and means
a	j13	-0.7928
ab	j9	-1.175
b	j7	-1.586
b	T-	-1.604

```
> LinearModel.3 <- lm(PR4 ~ Génotype, data=Dataset)
```

```
> summary(LinearModel.3)
```

Call:

```
lm(formula = PR4 ~ Génotype, data = Dataset)
```

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.09247	-0.20359	-0.00448	0.26982	0.82787

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	-1.7579	0.2571	-6.836	2.13e-06 ***
Génotype[T.H1]	0.2458	0.3637	0.676	0.5077
Génotype[T.H4]	0.6041	0.3637	1.661	0.1140
Génotype[T.I2]	0.5074	0.3637	1.395	0.1799
Génotype[T.K3]	0.9755	0.3637	2.682	0.0152 *
Génotype[T.P]	0.4771	0.3637	1.312	0.2061

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.5143 on 18 degrees of freedom  
Multiple R-squared: 0.3145, Adjusted R-squared: 0.1241  
F-statistic: 1.652 on 5 and 18 DF, p-value: 0.1973

```
> AnovaModel.4 <- aov(PR4 ~ Génotype, data=Dataset)
```

```
> summary(AnovaModel.4)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Génotype	5	2.184	0.4369	1.652	0.197
Residuals	18	4.761	0.2645		

```
> numSummary(Dataset$PR4 , groups=Dataset$Génotype, statistics=c("mean", "sd"))
```

	mean	sd	data:n
B	-1.7578692	0.5629583	4
H1	-1.5120700	0.3347772	4
H4	-1.1537324	0.6606511	4
I2	-1.2504286	0.1181256	4
K3	-0.7823737	0.7873466	4
P	-1.2808115	0.2959766	4

```
> waller.test(Dataset$PR4 , Dataset$Génotype, 18, 0.2645, 1.652)
```

Study:

Waller-Duncan K-ratio t Test for Dataset\$PR4

This test minimizes the Bayes risk under additive loss and certain other assumptions.

## Annexe 6 : Analyse statistique via le logiciel R : modèle linéaire du niveau d'expression

```
          .....
```

K ratio	100.0000
Error Degrees of Freedom	18.0000
Error Mean Square	0.2645
F value	1.6520
Critical Value of Waller	2.6640

Dataset\$Génotype, means

	Dataset.PR4	std.err	r	Min.	Max.
B	-1.7578692	0.28147916	4	-2.525060	-1.1773823
H1	-1.5120700	0.16738858	4	-1.759559	-1.0254922
H4	-1.1537324	0.33032554	4	-1.697942	-0.3258574
I2	-1.2504286	0.05906282	4	-1.371795	-1.0944780
K3	-0.7823737	0.39367329	4	-1.874848	-0.0799141
P	-1.2808115	0.14798831	4	-1.628998	-0.9136869

Minimum Significant Difference 0.9687954  
Means with the same letter are not significantly different.

Comparison of treatments

Groups, Treatments and means

a	K3	-0.7824
ab	H4	-1.154
ab	I2	-1.25
ab	P	-1.281
ab	H1	-1.512
b	B	-1.758

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```
PR1-RB76F/RB76R-c7 CCGGGGGGCGGTATGGGGAGAACCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTG
PR1-RB76F/RB76R-c2 CCGGGGGGCGGTATGGGGAGAACCTAGCTAAAGGCAGTGGCTCATTACAGGTACGGCTG
*****
```

```
PR1-RB76F/RB76R-c7 CCGTTAACTTGTGGGTGGCTGAGAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCA
PR1-RB76F/RB76R-c2 CCGTTAACTTGTGGGTGGCTGAGAAGGCTGATTATAATTACGCGACGAATACGTGTGCCA
*****
```

```
PR1-RB76F/RB76R-c7 GCGGGAAGGTGTGTGGGCACTATACCCAGGTCGTC
PR1-RB76F/RB76R-c2 GCGGGAAGGTGTGTGGGCACTATACCCAGGTCGTC
*****
```

```
>PR1-consensus_3
GGPYGENLAKSGSFTGTAAVNLLWVAEKADYNYATNTCASGKVCVGHYTVV
```

*Clones du gène PR1 obtenus à partir des amorces dégénérées RB76F et RB76R. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*

```
ERF2-RB108F/RB109R-c4 AAGGAAAACGATTCCGGAGGACATGGTACTCCAACAAGTCCTCGACGAGGC
ERF2-RB108F/RB109R-c8 AAGGAGAACGATTCCGGAGGACATGGTACTCCAACAAGTCCTCGACGAGGC
ERF2-RB108F/RB109R-c9 AAAGAGAACGATTCCGGAGGACATGGTACTCCAACAAGTCCTCGACGAGGC
ERF2-RB108F/RB109R-c7 AAGGAGAATGATTCCGGAAGACATGGTACTCCAACAAGTCCTCGACGAGGC
ERF2-RB108F/RB109R-c3 AAAGAGAATGATTCCGGAAGACATGGTACTCCAACAAGTCCTCGACGAGGC
** * * * * *
```

```
ERF2-RB108F/RB109R-c4 CCAAGCCATCACTCTTCCCCTCTACCACCAACAAGTCATCGAAATCCTG
ERF2-RB108F/RB109R-c8 CCAAGCCATCACTCTTCCCCTCTACCACCAACAAGTCATCGAAATCCTG
ERF2-RB108F/RB109R-c9 CCAAGCCATCACTCTTCCCCTCTACCACCAACAAGTCATCGAAATCCTG
ERF2-RB108F/RB109R-c7 CCAAGCCATCACTCTTCCCCTCTACCACCAACAAGTCATCGAAATCCTG
ERF2-RB108F/RB109R-c3 CCAAGCCATCACTCTTCCCCTCTACCACCAACAAGTCATCGAAATCCTG
*****
```

```
ERF2-RB108F/RB109R-c4 GTTCCGTCACCTGACCCAAACACGGGTCATAAGCAAGAAGAAGCACTACAGA
ERF2-RB108F/RB109R-c8 GTTCCGTCACCTGACCCAAACACGGGTCATAAGCAAGAAGAAGCACTACAGA
ERF2-RB108F/RB109R-c9 GTTCCGTCACCTGACCCAAACACGGGTCATAAGCAAGAAGAAGCACTACAGA
ERF2-RB108F/RB109R-c7 GTTCCGTCACCTGACCCAAACACGGGTCATAAGCAAGAAGAAGCACTACAGA
ERF2-RB108F/RB109R-c3 GTTCCGTCACCTGACCCAAACACGGGTCATAAGCAAGAAGAAGCACTACAGA
*****
```

```
ERF2-RB108F/RB109R-c4 GGGGTGAGGCGCGTCCTTGGGGAAAATTTGCCGCCGAGAT
ERF2-RB108F/RB109R-c8 GGGGTGAGGCGCGTCCTTGGGGCAAATTYGCCGCCGAGAT
ERF2-RB108F/RB109R-c9 GGGGTGAGGCGCGTCCTTGGGGAAAATTCGCCGCCGAGAT
ERF2-RB108F/RB109R-c7 GGGGTGAGGCGCGTCCTTGGGGCAAATTCGCCGCCGAAAT
ERF2-RB108F/RB109R-c3 GGGGTGAGGCGCGTCCTTGGGGAAAGTTGCCGCCGAGAT
*****
```

```
>ERF2-consensus_1
KENDSEDMVLQQVLDEAQAITLPLYHQSHRNPGSVTDPTRVI SKKKHYRGVRRRPWGKFAAEX
```

*Clones du gène ERF2 obtenus à partir des amorces dégénérées RB108F et RB109R. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```

PR4-RB101F/RB101R-c2 AAGTATGGGTGGACGGCGTTGTGTGGCCCTGTCGGACCTCGCGGCCAAGAATCCTGTGGC
PR4-RB101F/RB101R-c4 AAGTATGGGTGGACGGCGTTGTGTGGCCCTGTCGGACCTCGCGGCCAAGAATCCTGTGGC
PR4-RB101F/RB101R-c3 AAATATGGGTGGACGGCATTGTGTGGCCCTGTCGGACCTCGCGGCCAAGAATCCTGTGGC
PR4-RB101F/RB101R-c5 ----ATGGGTGGACGGCGTTGTGTGGCCCTGTCGGACCTCGCGGCCAAGAATCCTGTGGC
PR4-RB101F/RB101R-c1 -----GGTGGACGGCGTTGTGTGGCCCTGTCGGACCTCGTGGGCCAAGAATCCTGTGGC
*****

```

```

PR4-RB101F/RB101R-c2 AAGTGCTTAAGGGTAAGAATTGTTAATATAAGCCGTCGGAACAACTCCAATGTCTTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c4 AAGTGCTTAAGGGTAAGAATTGTTAATATAAGCCGTCGGAACAACTCCAATATCTTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c3 AAGTGCTTAAGGGTAAGAATTGTTAATATAAGCCGTCGGAACAACTCCAATATCTTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c5 AAGTGCTTAAGGGTAAGAATTGTTAATATAAGCCGTCGGAACAACTCCAATATCTTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c1 AAGTGCTTAAGGGTAAGAATTGTTAATATAAGCAGTCGGAACAACTCCAATATCCCTTT
*****

```

```

PR4-RB101F/RB101R-c2 TTTT----ATTAACTTCAGCTTAATATCGGTAGCCAGATTAATGTTAATTAATTATTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c4 TTTT----ATTAACTTCAGCTTAATATCGGTAGCCAGATTAATGTTAATTAATTATTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c3 TTTT----ATTAACTTCAGCTTAATATCGGTAGCCAGATTAATGTTAATTAATTATTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c5 TTTT----ATTAACTTCAGCTTAATATCGGTAGCCAGATTAATGTTAATTAATTATTTTT
PR4-RB101F/RB101R-c1 TTTTTATTAACTTCAGCTTAATATCAGTAGTCAAATT---GTTAATTAATTATTTTT
****

```

```

PR4-RB101F/RB101R-c2 TGTCGTATATTTTATAAAATGTTGGCATGCATGCAGGTTACTAGTACGAGGACAAACGCTC
PR4-RB101F/RB101R-c4 TGTCGTATATTTTATAAAATGTTGGCATGCATGCAGGTTACTAATACGAGGACAAACGCTC
PR4-RB101F/RB101R-c3 TGTCGTATATTTTATAAAATGTTGGCATGCATGCAGGTTACTAATACGAGGACAAACGCTC
PR4-RB101F/RB101R-c5 TGTCGTATATTTTATAAAATGTTGGCATGCATGCAGGTTACTAATACGAGGACAAACGCTC
PR4-RB101F/RB101R-c1 TGTC-TATATTTTATAAAATGTTGGCATGCATGCAGGTTACTAATACGAGGACAAACGCTC
****

```

```

PR4-RB101F/RB101R-c2 AACAAATGTGAGAATCGTGGATCAGTGCAGTAATGGTGGCCTGGATTGGATATCGGGG
PR4-RB101F/RB101R-c4 AACAAATGTGAGAATCGTGGATCAGTGCAGTAATGGTGGCCTGGATTGGATATCGGGG
PR4-RB101F/RB101R-c3 AACAAATGTGAGAATCGTGGATCAGTGCAGTAATGGTGGCCTGGATTGGATATCGGGG
PR4-RB101F/RB101R-c5 AACAAATGTGAGAATCGTGGATCAGTGCAGTAATGGTGGCCTGGATTGGATATCGGGG
PR4-RB101F/RB101R-c1 AACAAATGTGAGAATCGTGGATCAATGCAGTAATGGTGGCCTGGATTGGATATCGGGG
*****

```

```

PR4-RB101F/RB101R-c2 TGTTTAGGCAATTGGATACCGATGGACTTGGCAATCAGCAGGGCTTTTTGACTGTCAACT
PR4-RB101F/RB101R-c4 TGTTTAGGCAATTGGATACCGATGGACTTGGCAATCAGCAGGGCTTTTTGACTGTCAACT
PR4-RB101F/RB101R-c3 TGTTTAGGCAATTGGATACCGATGGACTTGGCAATCAGCAGGGCTTTTTGACTGTCAACT
PR4-RB101F/RB101R-c5 TGTTTAGGCAATTGGATACCGATGGACTTGGCAATCAGCAGGGCTTTTTGACTGTCAACT
PR4-RB101F/RB101R-c1 TGTTTAGGCAATTGGATACCGATGGACTTGGCAATCAGCAGGGCTTTTTGACTGTCAACT
*****

```

```

PR4-RB101F/RB101R-c2 ACCAATTCGTCAACTGTGG
PR4-RB101F/RB101R-c4 A-----
PR4-RB101F/RB101R-c3 ACCAATTCGTCAACTGCGG
PR4-RB101F/RB101R-c5 ATCAATTCGTCAATTGCGG
PR4-RB101F/RB101R-c1 ACCAATTCGTCAATTGCGG
*

```

```

>PR4-consensus_1
KYGWTALCGPVGPRGQESCGKCLRVTNTRTNAQQIVRIVDQCSNGLDLIDIGVFRQLD TDGLGNQQGFLTVNYQFVNCG

```

*Clones du gène PR4 obtenus à partir des amorces dégénérées RB101F et RB101R. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces, les motifs rouges correspondent aux motifs d'épissage de l'intron, et la zone colorée en jaune à l'intron mis en évidence après la traduction de ces séquences et l'alignement avec les séquences issues des bases de données. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*







## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

COI1-RB53F/RB54R-c11 GCTTTCTTTGCACAACAAAGTCCTCGAAACACTGAACTTTTACATGACCGATCTCACTAA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 GCTTTCTTTGCACAACAAAGTCCTCGAAACACTGAACTTTTACATGACCGATCTCACTAA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 AGTCAGCTTTGCAGATCTTGAATCTATAGGTGGGAATTGTCGTTCTTTAGTGTCTCTCAA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 AGTCAGCTTTGCAGATCTTGAATCTATAGGTAGGAATTGTCGTTCTT-AGTGTCTCTCAA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 AATTAGCGATTNGAAATTTGGATCTTGTGGTTTCCTAAGTGTGCAACCTCACTAGA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 AATTAGCGATTGTGAAATTT-GGATCTTGTGGTTTCCTAAGTGTGCAACCTCACTAGA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 AGAGTTTGCTGGAGGTTCTTCAATGATCAACCAGAACAGTATTTTCGTGTGCCAATCC  
COI1-RB53F/RB54R-c12 AGAGTTTGCCGGAGGTTCTTCAATGATCAACCATAACAGTATTTTCGTGTGCCAATCC  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TCCAAAATTATGCTTCTGGGTCTTACTTACATGGGGAAGCATGAAATGCCTATACTTTA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TCCAAAATTATGCTTCTGGGTCTTACTTACATGGGGAAGCATGAAATGCCTATACTTTA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TTCTTTTGCATCCCGTTTGAAAAAATTGGATCTTCTCTATGCTCTCCTTGACACAGAGGA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TTCTTTTGCATCCCGCTTGAAAAAATTGGATCTTCTCTATGCTCTCCTTGACACAGAGGA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 CCATTGTCGCTTACTTCAGAAATGCCGAACTTGAAATTTCTTGAGGTA AATTACTAAAC  
COI1-RB53F/RB54R-c12 CCATTGTCGCTTACTTCAGAAATGCCGAACTTGAAATTTCTTGAGGTA AATTACTAAAC  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 ATATTGCAAGTATCGTGCAGCTGAAAGTTTCTGTATTGAAATGAAAACATATTTCTCGCG  
COI1-RB53F/RB54R-c12 ATATTGCAAGTATCGTGCAGCTGAAAGTTTCTGTATTGAAATGAAAACATATTTCTCGCG  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 ACGTACGTGAGTCTTATCCTCTTGAACATATTAGCTTTTGTGCGGCATATTGTCAGTTC  
COI1-RB53F/RB54R-c12 ACGTACGTGAGTCTTATCCTCTTGAACATATTAGCTTTTGTGCGGCATATTGTCAGTTC  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 CATTTCCTTCTCCCAAGCAACAAGTATAATACATATGAAATAGAGGCGCTCTAAT  
COI1-RB53F/RB54R-c12 CATTTCCTTCTCCCAAGCAACAAGTATAATACATATGAAATAGAGGCGCTCTAAT  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TAAATGCATCAGTTGATCAGTCTCTTATCTCGACTTGCTCGAGTGATTTTCATGTGTTTC  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TAAATGCATCAGTTGATCAGTCTCTTATCTCGACTTGCTCGAGTGATTTTCATGTGTTTC  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TAAGGTTTGGTTTCCTATATGAATTTTCAATTTTGTAGGAGGTAATCCTTATAAAT  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TAAGGTTTGGTTTCCTATATGAATTTTCAATTTTGTAGGAGGTAATCCTTATAAAT  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TTGTAGTTCATCTGGTTAACTTTTTATCTGCTTAGGTCATTCATATTATACAATAGGTAA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TTGTAGTTCATCTGGTTAACTTTTTATCTGCTTAGGTCATTCATATTATACAATAGGTAA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 GTCCCTGTGAATTTATAATGTGCCAGACTGTAATTTGCAATATATGGCTACTTTATTCTT  
COI1-RB53F/RB54R-c12 GTCCCTGTGAATTTATAATGTGCCAGACTGTAATTTGCAATATATGGCTACTTTATTCTT  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TATAGGGTGGTAAAAATGTTGGACAAAACTAAATAAATTTTCCTTCTCTTTTCTCTTA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TATAGGGTGGTAAAAATGTTGGACAAAACTAAATAAATTTTCCTTCTCTTTTCTCTTA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TCTTCCATTGGACACTAGAAATGTGATTGGTGATAGAGGATTAGAAGTCTTGGTGC  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TCTTCCATTGGACACTAGAAATGTGATTGGTGATAGAGGATTAGAAGTCTTGGTGC  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 TTGTTGCAAGAAGCTGAAAAGGCTTAGGATAGAGTGAGGTGCTGATGAACAGGGCATGGA  
COI1-RB53F/RB54R-c12 TTGTTGCAAGAAGCTGAAAAGGCTTAGGATAGAGCGAGGTGCTGATGAACAGGATATGGA  
\*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB54R-c11 AGACGACGACG  
COI1-RB53F/RB54R-c12 AGATGACGACG  
\*\*\* \*\*\*\*\*

>COI1\_a-consensus\_1  
KVEKCSGFSTDGILLHITRGCNLRITLYLEESSIVEKDGEXLHELHSLHNKVLLETINFYMTDLTKVSFADLESIGXNCRSLVSLKISDXEILDVGLV  
FLSAATSLEEFAGGSFNDQPXQYFRVP IPPKLCFLGLTYMGKHEMPLIYSFASRLKLLDLLYALLDTEHCRLLQKCPNLEILETRNVIQDRGL  
EVLGRCKKLRRLRIEXGADEQXMEDDDX

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

COI1-RB53F/RB53R-c18 AAAGTGGAGAAATGTTCTGGTTTTTCTACTCTTGGCTTGCTGCATATTACTAGCTCTTGC  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 AAGGTGGAGAAATGCTCGGGTTTTTCTACTCTTGGCTTGCTGCATATTACTAGCTCTTGC  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 AGCTATACTCATTAAATTTTATGATTTTTTTTTTTTA--TAACTACTANAAATATGTGTG  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 AGCTATACTCATTAAATTTTATGATTTTTTTTTTTTATTAACTACTANAAATATGTGTG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 AATGAAATCTGTTTGTACACCTAATTGCAAGTTGAGGAANATTTAAGTGATTACTATGT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 AATGAAATCTGTTTGTTCNCCTAATTGCAAGTTGAGGAANATTTAAGTGATTACTATGT  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 GGCCTTTTCTTTAAGTTTGGGGATTATTCANAATAAGCTAATGTACTTGACTCAAAAT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 GGCCTTTTCTTTAAGTTTGGGGATTATTTANAATAAGCTAATGTACTTGACTCAAAA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 GGATGATAAGATTTCCGGTCGAAAAGTGTGAATAATTTGAGAAATTTGGGAAAAAGGTGT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 GGATGATAANATTTCCGGTCGAAAAGTGTGAATAATTTGAGAAATTTGGGAAAAAGGTGT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 GTGGCCTAACTAGGAGGAAAGTTTTTGGAACTTTGTATGTTTTACTGATAAGCTAGTGAA  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 GTGGCCTAACTAGGAGGAAAGTTTTTGGAACTTTGTATGTTTTATTGATAAGCTAANGAA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 ATGTGGTTCAAGGACAAAAGTTTTTCAATGTACATGCTTTAGTAAATATTTTCGTAAACCAT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 ATGAGGTTCAAGGACAAAAGTTTTTCAATGTACATGCTTTAGTAAATATTTTCGTAAACCAT  
 \*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 GACTTCCTGTTTTACANACTTACCTATATTGTTATATAAAGAGTCGGTGGTGTGTGTGT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 GACTTCCTGTTTTACAGACTTACCTATATTGTTATATAAAGAGTCGGTGGTGTGTGTGT  
 \*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 GGAATGCTTGGTTATGCCCAACCACACTCTGAGAATGATAATACAGTGTCAAATGCTTAT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 GGAATGCTTGGTTATGCCCAACCACACTCTGAGAATGATAATACAGTGTCAAATGCTTAT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 TATTAATTCATTGTATGAGCTTTTACTAAAGCTTAATGTTATTTTCTTATGACTTTTGA  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 TATTAATTCATTGTATGAGCTTTTACTAAAGCTTAAGTTATTTTCTTATGACTTTTGA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 TGTACTTCAGAAATTTAAGAACCTTGTATCTGGAAGAGAGTACAATCATTGAAAATGGCG  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 TGTACTTCAGAAATTTAAGAACCTTGTATCTGGAAGAGAGTACAATCATTGAAAATGGCG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 GGAATGGCTACATCAGCTTGCTTTGCACAACAAAGTTCTTGAAACTGAATTTCTATA  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 GGAATGGCTACATCAGCTTGCTTTGCACAACAAAGTTCTTGAAACTGAATTTCTATA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 TGACCGAGCTAGCTGAAGTCAGCCACCTTGACCTAGAACTTTTAGCCAAGAAGTGTAGCT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 TGACCGAGCTAGCTGAAGTCAGCCACCTTGACCTAGAACTTTTAGCCAAGAAGTGTAGCT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 CTCTTGCTCAGTCAAGATTAGTGATTGGAATTTTAAATCTTGCTGGTTTTTTCGAGG  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 CTCTTGCTCAGTCAAGATTAGTGATTGCGAAATTTTAAATCTTGCTGGTTTTTTCGAGG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 CTGCTTCTGCAC TAGAAGAATTTGGTGGTGGTTCCTTCAATGATCAACCAGAAATGTATA  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 CTGCTTCTGCAC TAGAAGAATTTGGTGGTGGTTCCTTCAATGATCAACCAGAAATGTATA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 AATACATGCCAATTTCCCAAAAATATGTATGCTGGGCTAACTTACTTAGGGAAGCATG  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 AATACATGCCAATTTCCCAAAAATATGTATGCTGGGCTAACTTACTTAGGGAAGCAGC  
 \*\*\*\*\* \*

COI1-RB53F/RB53R-c18 AATTGCCCATGTAATTTCTTTTGCATCTCGAATAAAGAAAGTGATCTTCTATGCTT  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 AATTGCCCATGTAATTTCTTTTGCATCTCGAATAAAGAAAGTGATCTTCTATGCTT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 TTCTTGACACTGAGGACCATTGCTATTAATTCAAAGGTGTCCTAACTTGAAATTTCTG  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 TTCTTGACACTGAGGACCATTGCTATTAATTCAAAGGTGTCCTAACTTGAAATTTCTG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

COI1-RB53F/RB53R-c18 AGCTAACTCACACAAGATTTCTGCATCTGTATATCAAGAATCTGTTTGTCTTCGATAG  
 COI1-RB53F/RB53R-c19 AGCTAACTCACACAAGATTTCTGCATCTGTATATCAAGAATCTGTTTGTCTTCGATAG  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```

COI1-RB53F/RB53R-c18   ATAGTGAAATCATT TTTATACAGTTTGGTACACCATAACAAATAGTCAAGGGAAGTGGT
COI1-RB53F/RB53R-c19   ATAGTGAAATCATT TTTATACAGTTTGGTACACCATAACAAATAGTCAAGGGAAGTGGT
*****

COI1-RB53F/RB53R-c18   GGCTTCTTTTGTG TACTCCCGTATTTACATTGAATGGTGTATAAAGTAATGACAATAAAC
COI1-RB53F/RB53R-c19   GGCTTCTTTTGTG TACTCCCGTATTTACATTGAATGGTGTATAAAGTAATGACAATAAAC
*****

COI1-RB53F/RB53R-c18   CTGAGATCCTAGT TTTCTTAAAGTAATCATTCTCAGTTCAAGTTCTTGCTTGGCTAATTGT
COI1-RB53F/RB53R-c19   CTGAGATCCTAGT TTTCTTAAAGTAATCATTCTCAGTTCAAGTTCTTGCTTGGCTAATTGT
*****

COI1-RB53F/RB53R-c18   TAGATCTTAAATAT GGTCTTTCTGTTATATTGAGGTAATTATGGAATGAAAACTCATGT
COI1-RB53F/RB53R-c19   TAGATCTTAAATAT GGTCTTTCTGTTATATTGAGGTAATTATGGAATGAAAACTCATGT
*****

COI1-RB53F/RB53R-c18   TAATTTTGT TTTATTTCGTTTTCGTTTCTTGTGTACAGACCAGGAATGTTATTGGTGATAGA
COI1-RB53F/RB53R-c19   TAATTTTGT TTTATTTCGTTTTCGTTTCTTGTGTACAGACCAGGAATGTTATTGGTGATAGA
*****

COI1-RB53F/RB53R-c18   GGATTGGGGTCC TTTGCAAATTTTGCAGAAATTGAGGAGGCTTAGGATTGAGCGAGGT
COI1-RB53F/RB53R-c19   GGATTGGGGTCC TTTGCAAATTTTGCAGAAATTGAGGAGGCTTAGGATTGAGCGAGGT
*****

COI1-RB53F/RB53R-c18   GCTGATGAACAAGG -----
COI1-RB53F/RB53R-c19   GCTGATGAACAAGG CTTGGAAGACGACGACG
*****

```

```

>COI1_b-consensus_1
KVEKCSGFSTLGLLHITSSCRNLRTLYLEESTIIENGGEWLHQLALHNKVLETLN FYMTELAEVSHLDLELLAKNCSSLSVSKI SDCEI LNLG
FXEAASALEEFGGGSFNDQPEMYKYMP IPPKICMLGLTYLGKHELPHVFPFASRIKKVDLLYAF LDTEDHCLLIQRCPNLEI L ETRNVIGDRGL
GVLANFCKKLRRLRIERGADEQGMEDDDX

```

```

COI1_a-consensus_1   KVEKCSGFSTDGLLHITRGCNLRRTLYLEESSIVEKDGEXLHELSLHNKVLETLN FYMTD
COI1_b-consensus_1   KVEKCSGFSTLGLLHITSSCRNLRTLYLEESTIIENGGEWLHQLALHNKVLETLN FYMTE
*****

COI1_a-consensus_1   LTKVSFADLESIGXNCRSLVSLKISDXEILDLVGFLSAATSLEEFAGGSFNDQPXQYFRV
COI1_b-consensus_1   LAEVSHLDLELLAKNCSSLSVSKI SDCEI LNLGFXEAASALEEFGGGSFNDQPEMYKYM
*.:** . ** :. * * ** : ** * * : * * . * : : * * . * * * * * * * * *

COI1_a-consensus_1   PIPPKLCLFLGLTYMGKHEMP ILYSFASRLKLDLLYALLDTEHDHCRLLQKCPNLEI L ETR
COI1_b-consensus_1   PIPPKICMLGLTYLGKHELPHVFPFASRIKKVDLLYAF LDTEDHCLLIQRCPNLEI L ETR
*****

COI1_a-consensus_1   NVIGDRGLEVLGRCKKLRRLRIEXGADEQXMEDDDX
COI1_b-consensus_1   NVIGDRGLGVLANFCKKLRRLRIERGADEQGMEDDDX
*****

```

*Clones du gène COI1 obtenus à partir des amorces dégénérées RB53F et RB54R (clones 11 et 12) et des amorces dégénérées RB53F et RB53R (clones 18 et 19). Les zones grisées correspondent aux sites des amorces, les zones colorées en jaune aux introns mis en évidence après la traduction de ces séquences et l'alignement avec les séquences issues des bases de données et les motifs rouges correspondent aux motifs d'épissage des introns. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

JAR1-RB47F/RB49R-c2  
JAR1-RB47F/RB49R-c4

```
ACITTYGARSARGTITGGGAAGAGATTTGTGCTGACATACGTGATGGAGTTCTCACAAAGT
ACITTYGARSARGTITGGGAAGAGATTTGTGCTGACATACGTGATGGAGTTCTCACAAAGT
*****
```

JAR1-RB47F/RB49R-c2  
JAR1-RB47F/RB49R-c4

```
CGAGTTACTGATCCAACCATTGCAACAGCTATTGCAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAA
CGAGTTACTGATCCAACCATTGCAACAGCTATTGCAAACTCCTCAAGCCAAATCCTGAA
*****
```

JAR1-RB47F/RB49R-c2  
JAR1-RB47F/RB49R-c4

```
TTGGCTAGTTTAATTCATGATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCA
TTGGCTAGTTTAATTCATGATGTGTGTTTCGGGGTTAAGCAATTGGTATGGTTTAATACCA
*****
```

JAR1-RB47F/RB49R-c2  
JAR1-RB47F/RB49R-c4

```
GCACTTTTTCCTAATGCCAAGTACATATATGGTATAATGACCCGGCACCATGGAACC
GCACTTTTTCCTAATGCCAAGTACATATATGGTATAATGACCCGGTCCATGGAACC
*****
```

>JAR1-consensus\_1  
TFEXVWEEICADIRDGLVTSRVTDPTIRTAIAKLLKPNPELASLIHDVCSGLSNWYGLIPALFPNAKYIYGIMTGTMEP

*Clones du gène JAR1 obtenus à partir des amorces dégénérées RB47F et RB49R. Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*

MYC2-RB57F/RB57R-c30  
MYC2-RB57F/RB58R-c33  
MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
TGGACGTACGCGATCTTTGGCAACC-----CA-----CA---TCC
TGGACGTATGCGATATTCTGGCAACC-----CA-----CA---TCC
TGGACGTATGCGATCTTTCTGGCAGCCGGATAACAACGCTACTTACGCGCCGTCAGCTTCC
TGGACGTACGCGATATTCTGGCAGCCGGATAACAACGCTACTTACGCGCCGTCAGCTTCC
*****
```

MYC2-RB57F/RB57R-c30  
MYC2-RB57F/RB58R-c33  
MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
TCTGTTCTCGGATGGGCTGATGGCTACTGCCAAGGCGATGATAAACAGAAGAAATCGCAA
TCTGTTCTCGGATGGGCTGATGGCTACTACCAAGGCGATGATAAACAGAAGAAATCGCAA
TCGATTCTTGGCTGGGCTGATGGGTATTACAAAGGAGAAGATAAGGAGAAG----GCGA
TCGATTCTTGGCTGGGCTGATGGGTATTACAAAGGAGAAGATAAGGAGAAG----GCGA
** ** ** ***** ** * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
```

MYC2-RB57F/RB57R-c30  
MYC2-RB57F/RB58R-c33  
MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
CCAATCAGCGCTACTTCAGCTGCTGAGCAGCAGCACCAGAAAGGAGTTCGGAGCCCTC
CCAATCAGCGCTGCTTCAGCTGCTGAGCAGCAGCACCAGAAAGGAGTTCGGAGCCCTC
G-GGCTAATGCTAGTTCCGCCGATGAGCAAGCTCACCAGAAAGGAGTTCGGAGCCCTC
G-GGCTAATGCTAGTTCCGCCGATGAGCAAGCTCACCAGAAAGGAGTTCGGAGCCCTC
** ** ** * ***** ***** * ** ** ** ** **
```

MYC2-RB57F/RB57R-c30  
MYC2-RB57F/RB58R-c33  
MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
AATTCTTTGATTCCGGCGCTGAGGCTTCTTCTAGTGACGACAATGGTATGAGGAGGTC
AATTCTTTGATTCCGGCGCTGAGGCTTCTTCTAGTGCGCAGCATGGTATGAGGAGGTC
AATTCGCTGATATCTGGCGGCGAGACTGGGTCGCTGATGAAGCTGTTGATGAGGAGGTC
AATTCGCTGATATCTGGCGGCGAGACTGGGTCGCTGATGAAGCTGTTGATGAGGAGGTC
*****
```

MYC2-RB57F/RB57R-c30  
MYC2-RB57F/RB58R-c33  
MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
ACCGACACCGACTGGTT
ACTGACACCGACTGGTT
ACCGACACCGACTGGTT
ACAGACACCGACTGGTT
** *****
```

MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
TGGACGTATGCGATCTTTCTGGCAGCCGGATAACAACGCTACTTACGCGCCGTCAGCTTCC
TGGACGTACGCGATATTCTGGCAGCCGGATAACAACGCTACTTACGCGCCGTCAGCTTCC
*****
```

MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
TCGATTCTTGGCTGGGCTGATGGGTATTACAAAGGAGAAGATAAGGAGAAGGCGAGGGCT
TCGATTCTTGGCTGGGCTGATGGGTATTACAAAGGAGAAGATAAGGAGAAGGCGAGGGCT
*****
```

MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
AATGCTAGTTCCGCCGATGAGCAAGCTCACCAGAAAGGAGTTCGGGAACTGAATTCG
TATGCTAGTTCCGCCGATGAGCAAGCTCACCAGAAAGGAGTTCGGGAACTGAATTCG
*****
```

MYC2-RB57F/RB57R-c29  
MYC2-RB57F/RB57R-c31

```
CTGATATCTGGCGGCGAGACTGGGTCGCTGATGAAGCTGTTGATGAGGAGGTCACCGAC
CTGATATCTGGCGGCGAGACTGGGTCGCTGATGAAGCTGTTGATGAGGAGGTCACCGAC
*****
```

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```

MYC2-RB57F/RB57R-c29      ACGGACTGGTT
MYC2-RB57F/RB57R-c31      ACGGACTGGTT
                            *****

>MYC2_a-consensus_1
WTYAIFWQPDNNATYAPSASSILGWADGYKGEDKEKARAXASSADEQAHRKKVLRSLNSLISGGQTGSPDEAVDEEVTDDWX

MYC2-RB57F/RB57R-c30      TGGACGTACGCGATCTTTTGGCAACCCACATCCTCTGTCTCGGATGGGCTGATGGCTAC
MYC2-RB57F/RB58R-c33      TGGACGTATGCGATATTCTGGCAACCCACATCCTCTGTCTCGGATGGGCTGATGGCTAC
                            *****

MYC2-RB57F/RB57R-c30      TGCCAAGGCGATGATAAACAGAAGAAATCGCAACCAATCAGCGCTACTTCAGCTGCTGAG
MYC2-RB57F/RB58R-c33      TACCAAGGCGATGATAAACAGAAGAAATCGCAACCAATCAGCGCTGCTTCAGCTGCTGAG
                            * *****

MYC2-RB57F/RB57R-c30      CAGCAGCACCGGAAAGAAGTGCTTCGGAGCCTCAATTCTTTGATTTCGGCGCTGAGGCT
MYC2-RB57F/RB58R-c33      CAGCAGCACCGGAAGGAAGTGCTTCGGAGCCTCAATTCTTTGATTTCGGCGCTGAGGCT
                            *****

MYC2-RB57F/RB57R-c30      TCTTCTAGTGACGACAATGGTGATGAGGAGGTACCCGACCCGACTGGTT
MYC2-RB57F/RB58R-c33      TCTTCTAGTGCGGACGATGGTGATGAGGAAGTCACTGACCCGACTGGTT
                            *****

>MYC2_b-consensus_1
WTYAIFWQPTSSVLGWADGYXQGDDKQKKSQPI SAXSAAEQHRKEVLRSLNSLISGAEASSSXDXGDEEVTDDWX

MYC2_a-consensus_1      WTYAIFWQPDNNATYAPSASSILGWADGYKGEDKEK-ARAX-ASSADEQAHRKKVLRSL
MYC2_b-consensus_1      WTYAIFWQP-----TSSVLGWADGYXQGDDKQKKSQPI SAXSAAEQHRKEVLRSL
                            *****
                                :*:***** :*:*: * :. . * * * * *:***.*

MYC2_a-consensus_1      NSLISGGQTGSPDEAVDEEVTDDWX
MYC2_b-consensus_1      NSLISGAEASSSXDXGDEEVTDDWX
                            *****.:*. : *****

```

*Clones du gène MYC2 obtenus à partir des amorces dégénérées RB57F et RB57R (clones 29, 30 et 31) et des amorces dégénérées RB57F et RB58R (clones 33). Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```
PAL-RB82F/RB82R-c1 AAGCCGAAACAAGAGAGGTACGCTCTGAGGACATCTCCTCAGTGGCTTGGTCTCAGATT
PAL-RB82F/RB82R-c2 AAACCGAAGCAGGAGAGGTACGCTCTGAGGACATCTCCTCAGTGGCTTGGTCTCAGATT
PAL-RB82F/RB83R-c5 AAGCCGAAACAGGAGAGGTATGCTCTGAGGACATCTCCTCAGTGGCTTGGTCTCAGATT
PAL-RB82F/RB83R-c3 AAACCGAACAAGAGAGGTATGCTCTGAGAACATCTCCTCAATGGCTTGGTCTCAAATT
PAL-RB82F/RB83R-c8 AAGCCGAAACAGGAGAGGTATGCTCTGAGAACATCTCCTCAATGGCTTGGTCTCAAATT
** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** **

PAL-RB82F/RB82R-c1 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAAAGAGAGATTAATTCNGTTAATGATAAC
PAL-RB82F/RB82R-c2 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAAAGAGAGATTAATTCGGTTAATGATAAC
PAL-RB82F/RB83R-c5 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAAAGAGAGATTAATTCGGTTAATGATAAC
PAL-RB82F/RB83R-c3 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAGAGATCAACTCTGTTAATGATAAC
PAL-RB82F/RB83R-c8 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAGAGATCAACTCTGTTAATGATAAC
***** ** ***** ***** ***** ***** ** * ***** *****

PAL-RB82F/RB82R-c1 CCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATACATGGTGGCAATTCCAGGGCAGCGCT
PAL-RB82F/RB82R-c2 CCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATACATGGTGGCAATTCCAGGGCAGCGCT
PAL-RB82F/RB83R-c5 CCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATACATGGTGGCAATTCCAGGGCAGCGCT
PAL-RB82F/RB83R-c3 CCCTTGATTGATGTTTCCAGGAACAAGGCTATACATGGTGGAAATTTCCAGGGAACCCCA
PAL-RB82F/RB83R-c8 CCCTTGATTGATGTTTCCAGGAACAAGGCTATACATGGTGGAAATTTCCAGGGAACCCCA
** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ** **

PAL-RB82F/RB82R-c1 ATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCTATTGCAGCTATTGGAAAGCTCATGTTT
PAL-RB82F/RB82R-c2 ATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCTATTGCANCTATTGGAAAGCTCATGTTT
PAL-RB82F/RB83R-c5 ATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCTATTGCAGCTATTGGAAAGCTCATGTTT
PAL-RB82F/RB83R-c3 ATCGGTGTTTCCATGGACAATACGCGTTTGGCTATAGCCGCCATTGGAAAATTGATGTTT
PAL-RB82F/RB83R-c8 ATCGGTGTTTCCATGGACAATACGCGTTTGGCTATAGCCGCCATTGGAAAATTGATGTTT
** * * * * ***** ***** ***** * * ***** * *****

PAL-RB82F/RB82R-c1 GCNCACTTTTCCGACCT
PAL-RB82F/RB82R-c2 GCACACTTTTCCGACCT
PAL-RB82F/RB83R-c5 GCCCACTTCAGTGACCT
PAL-RB82F/RB83R-c3 GCCCACTTTAGCGACTT
PAL-RB82F/RB83R-c8 GCCCACTTCAGCGACCT
** ***** ** *

PAL-RB82F/RB82R-c1 AAGCCGAAACAAGAGAGGTACGCTCTGAGGACATCTCCTCAGTGGCTTGGTCTCAGATT
PAL-RB82F/RB82R-c2 AAACCGAAGCAGGAGAGGTACGCTCTGAGGACATCTCCTCAGTGGCTTGGTCTCAGATT
PAL-RB82F/RB83R-c5 AAGCCGAAACAGGAGAGGTATGCTCTGAGGACATCTCCTCAGTGGCTTGGTCTCAGATT
** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

PAL-RB82F/RB82R-c1 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAAAGAGAGATTAATTCNGTTAATGATAAC
PAL-RB82F/RB82R-c2 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAAAGAGAGATTAATTCGGTTAATGATAAC
PAL-RB82F/RB83R-c5 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAAAGAGAGATTAATTCGGTTAATGATAAC
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

PAL-RB82F/RB82R-c1 CCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATACATGGTGGCAATTCCAGGGCAGCGCT
PAL-RB82F/RB82R-c2 CCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATACATGGTGGCAATTCCAGGGCAGCGCT
PAL-RB82F/RB83R-c5 CCCTTGATTGATGTTTCAAGAAACAAGGCTATACATGGTGGCAATTCCAGGGCAGCGCT
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

PAL-RB82F/RB82R-c1 ATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCTATTGCAGCTATTGGAAAGCTCATGTTT
PAL-RB82F/RB82R-c2 ATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCTATTGCANCTATTGGAAAGCTCATGTTT
PAL-RB82F/RB83R-c5 ATTGGAGTGTTCGATGGACAATACGCGTTTGGCTATTGCAGCTATTGGAAAGCTCATGTTT
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

PAL-RB82F/RB82R-c1 GCNCACTTTTCCGACCT
PAL-RB82F/RB82R-c2 GCACACTTTTCCGACCT
PAL-RB82F/RB83R-c5 GCCCACTTCAGTGACCT
** ***** *****

>PAL_a-consensus_1
KPKQERYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGVSMDNTRLAIAAIGKLMFAHFSDL

PAL-RB82F/RB83R-c3 AAACCGAACAAGAGAGGTATGCTCTGAGAACATCTCCTCAATGGCTTGGTCTCAAATT
PAL-RB82F/RB83R-c8 AAGCCGAAACAGGAGAGGTATGCTCTGAGAACATCTCCTCAATGGCTTGGTCTCAAATT
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

PAL-RB82F/RB83R-c3 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAGAGATCAACTCTGTTAATGATAAC
PAL-RB82F/RB83R-c8 GAAGTCATTTCGATCATCGACTAAAATGATTGAGAGAGAGATCAACTCTGTTAATGATAAC
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
```

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```

PAL-RB82F/RB83R-c3      CCGTTGATTGATGTTTCCAGGAACAAGGCTATACATGGTGGAAATTTCCAGGGAACCCCA
PAL-RB82F/RB83R-c8      CCGTTGATTGATGTTTCCAGGAACAAGGCTATACATGGTGGAAATTTCCAGGGAACCCCA
                          *****

PAL-RB82F/RB83R-c3      ATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAGCCGCCATTGGAAAATTGATGTTT
PAL-RB82F/RB83R-c8      ATCGGTGTTTCCATGGACAATACACGTTTGGCTATAGCCGCCATTGGAAAATTGATGTTT
                          *****

PAL-RB82F/RB83R-c3      GCCCACTTTAGCGACTT
PAL-RB82F/RB83R-c8      GCCCACTTCAGCGACCT
                          *****

>PAL_b-consensus_1
KPKQERYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAAIGKLMFAHFSDL

PAL_a-consensus_1      KPKQERYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTP
PAL_b-consensus_1      KPKQERYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKAIHGGNFQGTP
                          *****

PAL_a-consensus_1      IGVSMNTRLAIAAIGKLMFAHFSDL
PAL_b-consensus_1      IGVSMNTRLAIAAIGKLMFAHFSDL
                          *****

```

*Clones du gène PAL obtenus à partir des amorces dégénérées RB82F et RB82R (clones 1 et 2) et des amorces dégénérées RB82F et RB83R (clones 3, 5 et 8). Les zones grisées correspondent aux sites des amorces. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```

GLP-RB69F/RB69R-c4      ATTCGCAAGAGTTTTCGCTGGCTCAACCAACAGCCAAGST-----
GLP-RB69F/RB69R-c5      CCGCTGCAAGAGTTTTCGCTTGCCTCAACCAACAGCCAAGST-----
GLP-RB70F/RB69R-c6      CCGCTACAGGAGTTTTCGTGTGCTGATCCAAATAGCCAAGSTATGGTAATGTGCATGCAT
GLP-RB70F/RB69R-c9      CCGCTGCAAGAGTTTTCGTGTGCTGATCCAAATAGCCAAGSTATGGTAATGTGCATGCAT
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----ACATAT-----
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----ACATAT-----
GLP-RB70F/RB69R-c6      GCTTAACCTTATATCGGATTTCTGGCATGTGTCTATGTGCACATATTGGTGTGGTTCA
GLP-RB70F/RB69R-c9      GCTTAACCTTATATCGGATTTCTGGCATGTGTCCATGTGCACATATTGGTGTGGTTCA
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----ATAATAATTGT-----
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----ATAATAATTGT-----
GLP-RB70F/RB69R-c6      TGGTTAATGAGCCCGGTTAACAGGGATCGGAACCTTAATCCCATAACAAGTGTGGATT
GLP-RB70F/RB69R-c9      TGGTTAATGAGCCCGGTTAACAGGGATCGGAACCTTAATCCCATAACAAGTGTGGATT
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----
GLP-RB70F/RB69R-c6      AGTTACTTGGTGCCATGGAATGGGAACCCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCCTT
GLP-RB70F/RB69R-c9      AGTTACTTGGTGCCATGGAATGGGAGCCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCCTT
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----AGCTATTCTGA-----
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----AGCTATTCTGA-----
GLP-RB70F/RB69R-c6      CCCACCCTTGGGTTACCATACCATTCTGATTCTCATTAAACCCCATCCCATACCCTCC
GLP-RB70F/RB69R-c9      CCCACCCTTGGGTTACCATACCATTCTGATTCTCATTAAACCCCATCCCATACCCTCC
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----
GLP-RB70F/RB69R-c6      ATTCCCATTCCCGATTCCCATTTCTAACCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGT
GLP-RB70F/RB69R-c9      ATTCCCATTCCCGATTCCCATTTCTAACCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGT
GLP-RB69F/RB69R-c4      --AGCCGCTTCTATTGC-----
GLP-RB69F/RB69R-c5      --AGCCGCTTCTATTGC-----
GLP-RB70F/RB69R-c6      GCAGACACTTTTATCTCCACATCACTCAAAGTGTACACTAACACAGGACACCATGTCC
GLP-RB70F/RB69R-c9      GCGGACACTTTTATCTCCACATCACTCAAAGTGTACACTAACACAGGACACCATGTCC
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----ATTT
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----ATTT
GLP-RB70F/RB69R-c6      CTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAAATAAAAGAAAATATTGTTGTCGACAAGTTACTT
GLP-RB70F/RB69R-c9      CTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAAATAAAAGAAAATATTGTTGTCGACAAGTTACTT
                        * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      ATAGATCTTCGGAGATT-----CTTTAACATGCACGTCTCA
GLP-RB69F/RB69R-c5      ATAGATCTTCGGAGATT-----CTTTAACATGCACGTCTCA
GLP-RB70F/RB69R-c6      TTAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCACTGCATTGTGGATGCTCTAACACCCACTTTTTA
GLP-RB70F/RB69R-c9      TTAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCACTGCATTGTGGATGCTCTAACACCCACTTTTTA
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      CACTTACTGGTCTATTGCTTACTACTACAA-----
GLP-RB69F/RB69R-c5      CACTTACTGGTCTATTGCTTACTACTACAA-----
GLP-RB70F/RB69R-c6      -GTTAGGTGACGGATTGTATTGACTCTGATTTTCATTAATAATGATGGTCCCACATGCA
GLP-RB70F/RB69R-c9      -GTTAGGTGACGGATTGTATTGACTCTGATTTTCATTAATAATGATGGTCCCACATGCA
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----
GLP-RB70F/RB69R-c6      TAAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTCCACTTAGATAAAAAATAATTTTGTATTACTTC
GLP-RB70F/RB69R-c9      TAAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTCCACTTAGATAAAAAATAATTTTGTATTACTTC
GLP-RB69F/RB69R-c4      -----ATTGCACTGCTCTTAAATGGATTA
GLP-RB69F/RB69R-c5      -----ATTGCACTGCTCTTAAATGGATTA
GLP-RB70F/RB69R-c6      TAATTATCTAGTACTTGATTGATGAATTCGTCTTATTTCACTGCTGGTTAATGGACTT
GLP-RB70F/RB69R-c9      TAATTATCTAGTACTTGATTGATGAATTCGTCTTATTTCACTGCTGGTTAATGGACTT
                        * * * * *
GLP-RB69F/RB69R-c4      GCATGCAAGAATCCGAGCACGGTTCAAGCCAGCGACTTTTCTTTCAGCGGACTTTCATATA
GLP-RB69F/RB69R-c5      GCATGCAAGAATCCGAGCACGGTTCAAGCCAGCGACTTTTCTTTCAGCGGACTTTCATATA
GLP-RB70F/RB69R-c6      GTTTGTAAGAACCAGCAACCGGACTGCAGAGGACTTCTTCCAGTGGATTGAATGAA
GLP-RB70F/RB69R-c9      GTTTGTAAGAACCAGCAACCGGACTGCAGAGGACTTCTTCCAGTGGATTGAATGAA
                        * * * * *

```

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

```

GLP-RB69F/RB69R-c4      TCAGGCAACACAAGCAATGCAGTTGGCTCGAGAGTAACTCCTGTGGCTGCAACTCAAATT
GLP-RB69F/RB69R-c5      TCAGGCAACACAAGCAATGCAGTTGGCTCGAGAGTAACTCCTGTGGCTGCAACTCAAATT
GLP-RB70F/RB69R-c6      GCAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGATCAAATGTAAGTCTAGTGAATGTTGTCCGGATT
GLP-RB70F/RB69R-c9      GCAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGATCAAATGTAAGTCTAGTGAATGTTGTCCGGATT
                          **** *
GLP-RB69F/RB69R-c4      CCAGGACTAAATACCCTAGGCATCTCCCTTGTCCGATTGACTACGCTCCATGGGGCCTC
GLP-RB69F/RB69R-c5      CCAGGACTAAATACCCTAGGCATCTCCCTTGTCCGATTGACTACGCTCCATGGGGCCTC
GLP-RB70F/RB69R-c6      CCTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCATTGCTCGTACCGACTATGCACCAAGGGGAATC
GLP-RB70F/RB69R-c9      CCTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCATTGCTCGTACCGACTATGCACCAAGGGGAATC
                          ** *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      ACCCCCCCCACACCCACCCAG
GLP-RB69F/RB69R-c5      AATCCCCCCACACCCACCCAG
GLP-RB70F/RB69R-c6      AACCCCCCCACACCCACCCAG
GLP-RB70F/RB69R-c9      AACCCCCCCACACCCACCCAG
                          ** *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      ATTCTGCAAGAGTTTTCGCTGGCTCAACCAACAGCCAAGTACATATATAATAATTGTA
GLP-RB69F/RB69R-c5      CCGCTGCAAGAGTTTTCGCTGGCTCAACCAACAGCCAAGTACATATATAATAATTGTA
                          *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      GCTATTCTGAAGCCGCTTCTATTGCATTTATAGATCTTCGGAGATTCTTTAACATGCACG
GLP-RB69F/RB69R-c5      GCTATTCTGAAGCCGCTTCTATTGCATTTATAGATCTTCGGAGATTCTTTAACATGCACG
                          *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      TCTCACACTTACTGGTCTATTGCTTACTACAAATTCAGTGTCTCTTAAATGGATTAG
GLP-RB69F/RB69R-c5      TCTCACACTTACTGGTCTATTGCTTACTACAAATTCAGTGTCTCTTAAATGGATTAG
                          *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      CATGCAAGAATCCGAGCACGGTTCAGCCAGCGACTTTTCTTTCAGCGGACTTCATATAT
GLP-RB69F/RB69R-c5      CATGCAAGAATCCGAGCACGGTTCAGCCAGCGACTTTTCTTTCAGCGGACTTCATATAT
                          *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      CAGGCAACACAAGCAATGCAGTTGGCTCGAGAGTAACTCCTGTGGCTGCAACTCAAATTC
GLP-RB69F/RB69R-c5      CAGGCAACACAAGCAATGCAGTTGGCTCGAGAGTAACTCCTGTGGCTGCAACTCAAATTC
                          *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      CAGGACTAAATACCCTAGGCATCTCCCTTGTCCGATTGACTACGCTCCATGGGGCCTCA
GLP-RB69F/RB69R-c5      CAGGACTAAATACCCTAGGCATCTCCCTTGTCCGATTGACTACGCTCCATGGGGCCTCA
                          *****
GLP-RB69F/RB69R-c4      ACCCCCCCCACACCCACCCAG
GLP-RB69F/RB69R-c5      ATCCCCCCACACCCACCCAG
                          * *****

>GLP_a-consensus_1
ILQEFCVAQPNSQVLLNGLACKNPSTVQASDFSFSGLHISGNTSNAVGSRVTPVAATQIPGLNLTGLISLVRIDYAPWGLNPPHHPX

GLP-RB70F/RB69R-c6      CCGCTACAGGAGTTTGTGTTGCTGATCCAAATAGCCAAGTATGGTAATGTGCATGCAT
GLP-RB70F/RB69R-c9      CCGCTGCAAGGAGTTTGTGTTGCTGATCCAAATAGCCAAGTATGGTAATGTGCATGCAT
                          *****
GLP-RB70F/RB69R-c6      GCTTAACTTATATCGGATTTTCTGGCATGTGTCTATGTGCACATATTGGTGTGGTTCA
GLP-RB70F/RB69R-c9      GCTTAACTTATATCGGATTTTCTGGCATGTGTCCATGTGCACATATTGGTGTGGTTCA
                          *****
GLP-RB70F/RB69R-c6      TGGTTAATGAGCCCGTTAACAGGGATCGGAACCTTAATCCCATAACAAGTGTGGATT
GLP-RB70F/RB69R-c9      TGGTTAATGAGCCCGTTAACAGGGATCGGAACCTTAATCCCATAACAAGTGTGGATT
                          *****
GLP-RB70F/RB69R-c6      AGTTACTTGGTGCCATGGAATGGGAACCCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCTT
GLP-RB70F/RB69R-c9      AGTTATTGGTGCCATGGAATGGGAGCCCAATCCTTTTAGGTGGTTAAATCATACCTT
                          *****
GLP-RB70F/RB69R-c6      CCCACCCCTTGGGTTACCATAACCTTCTGATTCTCATTAAACCCCATCCCATACCCCTCC
GLP-RB70F/RB69R-c9      CCCACCCCTTGGGTTACCATAACCTTCTGATTCTCATTAAACCCCATCCCATACCCCTCC
                          *****

```

## Annexe 7 : Séquences des clones obtenus *via* l'utilisation d'amorces dégénérées

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
ATTCCCATTCCCGATTCCCATTTCTAACCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGT  
ATTCCCATTCCCGATTCCCATTTCTAACCTCAATCCAAACGCCCCCTAAGAATACTCAGT  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
GCAGACACTTTTATCTCCACATCACCTCAAACGTACACTAACCAACAGGACACCATGTCC  
CGGACACTTTTATCTCCACATCACCTCAAACGTACACTAACCAACAGGACACCATGTCC  
\*\* \*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
CTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAAATAAAAGAAAATATTGTTGTCGACAAGTTACTT  
CTGGCCACTTTCTGCTCCTCTCATAAAATAAAAGAAAATATTGTTGTCGACAAGTTACTT  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
TTAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCACTGCATTGTGGATGCTCTAACCAACCACCTTTTA  
TTAATGTTCCGAAGACTAATTTGTCCACTGCATTGTGGATGCTCTAACCAACCACCTTTTA  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
GTTAGGTGACGGATTTGTATTGACTCTGATTTTCATTAATAATGATGGTCCCCACATGCAT  
GTTAGGTGACGGATTTGTATTGACTCTGATTTTCATTAATAATGATGGTCCCCACATGCAT  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
AAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTCCACTTAGATAAAAAATAATTTTGGATTACTTCT  
AAAAATTTTCACCCAGGCAAAATCTTCCACTTAGATAAAAAATAATTTTGGATTACTTCT  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
AATTATCTAGTACTTGATTGATGAATTCTGTTCTTATTTCCAGTGCCTGGTTAATGGACTTG  
AATTATCTAGTACTTGATTGATGAATTCTGTTCTTATTTCCAGTGCCTGGTTAATGGACTTG  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
TTTGTAAAGAACCCGAACAACGCGACTGCAGAGGACTTCTTACCAGTGGATTGAATGAAG  
TTTGTAAAGAACCCGAACAACGCGACTGCAGAGGACTTCTTACCAGTGGATTGAATGAAG  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
CAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGATCAAATGTAACCTAGTGAATGTTGTCGGATTCC  
CAGGGGACACCTCGAATGCAGTTGGATCAAATGTAACCTAGTGAATGTTGTCGGATTCC  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
CTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCCATTGCTCGTACCGACTATGCACCAAGGGGAATCA  
CTGGACTCAACACTCTCAGCCTTTCCATTGCTCGTACCGACTATGCACCAAGGGGAATCA  
\*\*\*\*\*

GLP-RB70F/RB69R-c6  
GLP-RB70F/RB69R-c9  
ACCCCCCCACACCCACCCAG  
ACCCCCCCACACCCACCCAG  
\*\*\*\*\*

>GPL\_b-consensus\_1  
PLQEFVADPNSQVLVNLVCKNPNNATAEDFFTSGLNEAGDTSNAVGSNVTLVNVVRIPGLNLTLSLSIARXDYAPRGINPPHHPX

GLP\_a-consensus\_1  
ILQEFVADPNSQVLVNLVCKNPSTVQASDFSFGLHISGNTSNAVGSRVTPVAATQIP  
GPL\_b-consensus\_1  
PLQEFVADPNSQVLVNLVCKNPNNATAEDFFTSGLNEAGDTSNAVGSNVTLVNVVRIP  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*.\*\*\*\*. . . \* . \*\* \*\*\* : :\*:\*\*\*\*\*.\* \* ..:\*\*

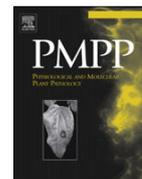
GLP\_a-consensus\_1  
GLNLTGISLVRIDYAPWGLNPPHHPX  
GPL\_b-consensus\_1  
GLNLTLSLSIARXDYAPRGINPPHHPX  
\*\*\*\*\*.:\*:\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

*Clones du gène GLP obtenus à partir des amorces dégénérées RB69F et RB69R (clones 4 et 5) et des amorces dégénérées RB70F et RB69R (clones 6 et 9). Les zones grisées correspondent aux sites des amorces, les motifs rouges correspondent aux motifs d'épissage de l'intron, et les zones colorées en jaune à l'intron mis en évidence après la traduction de ces séquences et l'alignement avec les séquences issues des bases de données. La séquence consensus est traduite en séquence peptidique.*



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Physiological and Molecular Plant Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/pmpp](http://www.elsevier.com/locate/pmpp)

### Editorial

## Secondary metabolites and defense: The story continues

Plants and microbes produce a phenomenal array of compounds collectively known as secondary metabolites. On the microbial side of the biological world, many secondary metabolites are powerful antibiotics and have found important applications in human medicine and likely play some role in the ecology of the producing microbe. Other metabolites are known to suppress plant pathogens and have a role in biological control of plant disease. Certain plant pathogens produce compounds that are toxic to plant tissues and a number of these metabolites have been shown to play a role in pathogen virulence or pathogenicity. To counter pathogen attack, plants produce antimicrobial compounds either constitutively (phytoanticipins) or after infection (phytoalexins) as part of the overall arsenal of plant defenses.

Phytoalexins and phytoanticipins [1–4] have been described from many plant families. However, as I have stated earlier, only in a few cases do we know the relative importance of these antimicrobials in plants defense and more work is needed to define these roles [2,5,6]. In some plant species, the antimicrobial defenses are expressed as both phytoalexins and phytoanticipins. Carrot, *Daucus carota*, is one such species. Antimicrobial compounds such as the polyketide-derived 6-methoxymellein, the fatty acid derived polyacetylenes falcarinol and falcarindiol, and the phenols 4-hydroxybenzoic acid and chlorogenic acid have all been associated with defense of carrot roots to infection [7–11]. 6-Methoxymellein has also been reported to function as a phytoalexin in carrot leaves [12]. Thus, it would appear that carrot has a diverse group of antimicrobial chemistries at its disposal for defense against infection.

However, and similar to many other host pathogen interactions, the relative contribution of these carrot defense chemistries to pathogen resistance still needs further clarification. In this issue, Lecomte et al. [13] examine the ability of 6-methoxymellein and falcarindiol to inhibit growth of *Alternaria* species pathogenic and non-pathogenic on carrot. Testing the effect of 6-methoxymellein on conidial germination and germ tube growth, all of the isolates of *Alternaria dauci* (a carrot pathogen) were more tolerant of this compound than were isolates of the crucifer pathogen *Alternaria brassicicola*. The tolerance to 6-methoxymellein was, however, not correlated with virulence of the *A. dauci* isolates. Using a technique known as nephrometry, the authors examined the effect of 6-methoxymellein on fungal growth. Five *A. dauci* and two *Alternaria radicina* (all isolated from carrot) strains were tested. In this case, there was also no relationship between tolerance to the compound and virulence of the isolates. What was interesting to note was that IC<sub>50</sub> values for germination and germ tube growth were higher than similar values for hyphal growth, which may suggested that

these compounds may be more effective against colonization growth of the pathogens in infected tissues.

Comparing 6-methoxymellein accumulation in *A. dauci* infected susceptible and partially resistant carrot cultivar foliage, Lecomte et al. [13] reported that even though both varieties had similar amounts this compound prior to infection. However, infection stimulated faster and greater accumulation of 6-methoxymellein in the resistant cultivar, and further suggests that this compound may function both as a phytoanticipin and a phytoalexin.

Lecomte et al. [13] also examined the effect of falcarindiol on growth of *A. dauci* and *A. brassicicola*. Similar to their results with 6-methoxymellein, there was no correlation between pathogenicity or virulence and tolerance of this compound. It is interesting to note that falcarindiol had IC<sub>50</sub> values in the 40–100 μM range which was lower than that found for 6-methoxymellein. The authors also reported that the falcarindiol content of the leaves of uninfected resistant plants was higher than the susceptible variety. Infection with *A. dauci* resulted in an increase in falcarindiol content, suggesting that this compound might also function as a phytoanticipin and a phytoalexin.

Falcarindiol appears to be present in resistant cultivar leaf tissues at concentrations that exceed the IC<sub>50</sub> for growth prior to infection and 6-methoxymellein increases after infection to concentrations that should have some effect on fungal growth [13]. Thus, collectively, the two compounds should have an effect on fungal growth in the host. Since both compounds are present at the same time, it is possible that the compounds may have a synergistic effect on stopping fungal growth. Lecomte et al. tested this, but found the effects are only additive.

The results of the Lecomte et al. study [13] provide further information on how the antifungal compounds 6-methoxymellein and falcarindiol may aid carrot foliage in resistance to *Alternaria*. However, it is still important to conduct studies that will lead to a quantification of these compounds at the actual site of infection, thus providing data that will further help evaluate the role of these compounds in defense. However, knowing the negative effects that these compounds may have on sensory quality of the carrot root [14], the authors are quite correct in their caution that overproduction of these antifungal compounds as a plant defense strategy must be evaluated carefully.

### References

- [1] Ahuja I, Kissen R, Bones Atle M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* 2012;17:73–90.

## Annexe 8 : Éditorial de PMPP (octobre 2012) par Hammerschmidt

iv

Editorial / *Physiological and Molecular Plant Pathology* 80 (2012) iii–iv

- [2] Hammerschmidt R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu Rev Phytopathol* 1999;37:285–306.
- [3] Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 2001;411:843–7.
- [4] Morrissey JP, Osbourn AE. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999;63:708–24.
- [5] Hammerschmidt R. Phytoalexin accumulation: response or defense. *Physiol Mol Plant Pathol* 2003;62:125–6.
- [6] Hammerschmidt R. Secondary metabolites and resistance: more evidence for a classical defense. *Physiol Mol Plant Pathol* 2004;65:169–70.
- [7] Condon P, Kuć J, Draudt HN. Production of 3-methyl-6-methoxy-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarin by carrot root tissue. *Phytopathology* 1963;53:1244–50.
- [8] Condon P, Kuć J. Isolation of a fungitoxic compound from carrot root tissue inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 1960;50:267–70.
- [9] Garrod B, Lewis BG, Coxon DT. Cis-hepta-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol, and anti-fungal compound from carrot root tissue. *Physiol Plant Pathol* 1978;13:241–6.
- [10] Harding VK, Heale JB. Isolation and identification of the antifungal compounds accumulating in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiol Plant Pathol* 1980;17:277–89.
- [11] Mercier J, Ponnampalam R, Berard LS, Arul J. Polyacetylene content and UV-induced 6-methoxymellein accumulation in carrot cultivars. *J Sci Food Agric* 1993;63:313–7.
- [12] Mercier J, Kuć J. Elicitation of 6-methoxymellein in carrot leaves by *Cercospora carotae*. *J Sci Food Agric* 1997;73:60–2.
- [13] Lecomte M, Berruyer R, Hamama L, Boedo C, et al. Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and faltarindiol on development of the fungal leaf blight pathogen *Alternaria dauci*. *Physiol Mol Plant Pathol* 2012;80:58–67.
- [14] Kramer M, Bufler G, Ulrich D, Leitenberger M, Conrad J, Carle R, et al. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on bitter compounds in carrots (*Daucus carota* L.). *Postharvest Biol Tec* 2012;73:28–36.

R. Hammerschmidt

Department of Plant, Soil and Microbial Sciences, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1311, USA  
E-mail address: [hammersr@anr.msu.edu](mailto:hammersr@anr.msu.edu)



## Effets inhibiteurs de la phytoalexine 6-méthoxymelléine sur le développement d'*Alternaria dauci*, agent de la brûlure foliaire de la carotte.

Mickaël LECOMTE<sup>1,2</sup>, Latifa HAMAMA<sup>1,2</sup>, Cora BOEDO<sup>2</sup>, Piétrick HUDHOMME<sup>3</sup>, Stéphanie BERSIHAND<sup>2</sup>, Guillaume N'GUYEN<sup>2</sup>, Mathilde BRIARD<sup>1</sup>, Philippe SIMONEAU<sup>2</sup>, Valérie LE CLERC<sup>1</sup>, Pascal POUPARD<sup>2</sup>, Romain BERRUYER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agrocampus Ouest, Institut de Recherche en Horticulture et Semences (INRA, Agrocampus Ouest, Université d'Angers), SFR 149 QUASAV, F-49045 Angers, France.  
<sup>2</sup>Université d'Angers, Institut de Recherche en Horticulture et Semences (INRA, Agrocampus Ouest, Université d'Angers), SFR 149 QUASAV, F-49045 Angers, France.  
<sup>3</sup>Université d'Angers, Moltech Anjou, UMR CNRS CIMA 6200, F-49045 Angers, France.

### Introduction

La résistance des plantes face aux agents pathogènes peut être due, au moins en partie, à la production de métabolites de défense.

Chez la carotte (*Daucus carota*), une phytoalexine particulière, la 6-méthoxymelléine (6-MM), est connue pour son effet antifongique sur des champignons pathogènes de la racine (Mercier *et al.*, 2000).

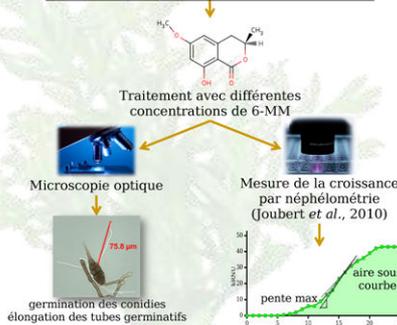
Nos recherches concernent le champignon nécrotrophe *Alternaria dauci*, responsable de la brûlure foliaire de la carotte. Notre objectif est d'étudier le rôle de la 6-MM dans l'interaction entre *A. dauci* et la carotte, et ainsi répondre aux questions suivantes :

- ✓ la 6-MM a-t-elle un rôle dans la résistance partielle de la carotte à *A. dauci* ?
- ✓ existe-t-il un lien entre la sensibilité d'*A. dauci* à la 6-MM et les différents niveaux d'agressivité du champignon ?

### Matériel et méthodes

#### Sensibilité du champignon à la 6-MM :

Espèce	Souche	Agressivité (Boedo <i>et al.</i> , 2011)
<i>A. dauci</i>	FRA016	donnée non disponible
	FRA017	
	FRA001	
	AUS001	
	FRA018	
<i>A. brassicicola</i>	BRA002	non pathogène sur carotte
	Abra18b	
	Abra43	



#### Dosage de la 6-MM in planta :

Inoculation avec *A. dauci* (souche FRA017), de deux génotypes (Boléro et Presto, respectivement partiellement résistant et sensible).

Extraction de la 6-MM (Seljåsen *et al.*, 2000) à partir des feuilles collectées à différents temps post-inoculation.



### Résultats

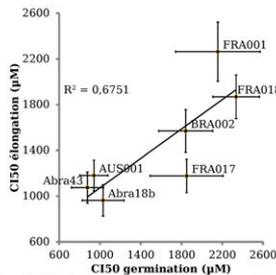


Fig. 1 : CI50 de la 6-MM sur la germination conidienne et l'élongation des tubes germinatifs, calculées à partir de mesures de microscopie sur différentes souches d'*A. dauci* et d'*A. brassicicola*. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95%.

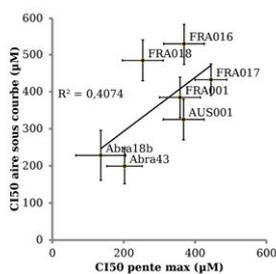


Fig. 2 : CI50 de la 6-MM sur la croissance fongique mesurées par néphélogéométrie sur différentes souches d'*A. dauci* et d'*A. brassicicola*. Les CI50 sont calculées à partir de la pente maximale et de l'aire sous la courbe de croissance. Les barres d'erreur représentent les erreurs types.

#### Effet de la 6-MM sur la germination conidienne et l'élongation des tubes germinatifs (Fig. 1)

- CI50 comprises entre 1 et 2.5 mM montrant des variations de sensibilité des souches d'*A. dauci*.
- Les souches d'*A. brassicicola* (espèce non pathogène de la carotte) sont les plus sensibles à la 6-MM.
- Bonne corrélation entre les critères germination conidienne et élongation des tubes germinatifs ( $R^2=0,675$ ).
- Pas de corrélation évidente entre l'agressivité des souches d'*A. dauci* et leur sensibilité à la phytoalexine.

#### Effet de la 6-MM sur la croissance mycélienne (Fig. 2)

- CI50 plus faibles par rapport aux données de microscopie.
- Aire sous courbe et pente max sont moyennement corrélés ( $R^2=0,407$ ).
- Forte corrélation entre aire sous courbe et germination conidienne ( $R^2=0,788$ ) (données non présentées).
- Sensibilité des souches d'*A. dauci* à la 6-MM environ deux fois moins élevée que celle des souches d'*A. brassicicola*.
- ⇒ la 6-MM pourrait être impliquée dans des mécanismes de résistance non-hôte.

#### Dosage de la 6-MM in planta (Fig. 3 et 4)

- 6-MM présente dans les feuilles de carotte infectées par *A. dauci* (Fig. 3).
- Augmentation exponentielle de la teneur en 6-MM chez les deux génotypes en fonction du temps, en réponse à l'infection.
- Production significativement plus rapide observée chez Boléro en comparaison avec Presto : teneur jusqu'à 6 fois plus élevée chez Boléro à 13 jours post-inoculation.
- ⇒ la teneur en 6-MM et le niveau de résistance des cultivars sont corrélés. Cette phytoalexine pourrait être impliquée dans les mécanismes de résistance partielle.

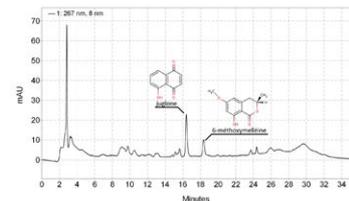


Fig. 3 : Détection de la 6-MM dans les feuilles de carotte. Utilisation d'une molécule standard interne, la juglone.

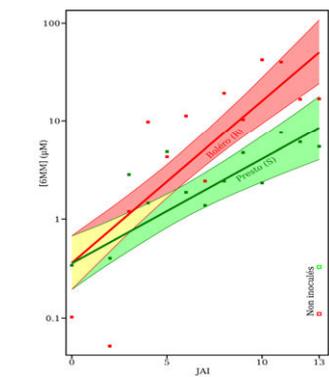


Fig. 4 : Teneur en 6-MM exprimée en  $\log([6\text{-MM}])$  dans les feuilles de deux génotypes de carotte en fonction du temps après inoculation par *A. dauci*. Les enveloppes des droites de régression représentent les intervalles de confiance à 95%.

### Conclusions

- La synthèse de 6-MM est induite par l'agent pathogène.
- Cette synthèse est significativement plus importante chez le cultivar partiellement résistant. Ces résultats peuvent être reliés à une précédente étude (Boedo *et al.*, 2010) où, dans les mêmes conditions d'inoculation, Boléro est significativement moins sensible que Presto à *A. dauci*.

- Les concentrations en 6-MM mesurées in planta sont compatibles avec les valeurs de CI50 obtenues in vitro.
- Une plus forte activité in vitro contre *A. brassicicola*, non pathogène de la carotte, a été observée. Un lien semble donc exister entre sensibilité à la 6-MM et spécificité d'hôte.

### Bibliographie :

C. Boedo, R. Berruyer, M. Lecomte, S. Bersihand, M. Briard, V. Le Clerc, P. Simoneau et P. Poupard (2010). Plant Pathology 59: 368-375.  
 C. Boedo, S. Benichou, R. Berruyer, S. Bersihand, A. Dongo, P. Simoneau, M. Lecomte, M. Briard, V. Le Clerc, P. Poupard (2011). Plant Pathology (published online).  
 A. Joubert, B. Calmes, R. Berruyer, M. Pihet, J-P Bouchara, P. Simoneau, T. Guillemette (2010). BioTechniques 48: 399-404.  
 J. Mercier, D. Roussel, M-T Charles and J. Arul (2000). Phytopathology 90: 981-986.  
 R. Seljåsen, G.B. Bengtsson, G. Skrede and G. Vogt (2000). Food Chemistry 70: 397-401.

Ce travail a été rendu possible par le soutien financier de Clause Végétale Soeils (bourse thèse CIFRE 2006-2009) et du projet "Création Variété Potagère" (Fond Unique Interministériel 2007-2010). Remerciements à B. Hamon, R. Vandamme, J. Granger, R. Gardet, S. Huet et A. Suel pour leur assistance technique, et à A. Joubert et B. Calmes pour la néphélogéométrie.

Conception Mickaël LECOMTE (mickaël.lecomte@agrocampus-ouest.fr) - décembre 2011

## EXPLORING PLANT DEFENSE PATHWAYS IN THE CARROT-*ALTERNARIA DAUCI* PATHOSYSTEM, A NON- MODEL INTERACTION

M. LECOMTE<sup>1</sup>, C. ALEND<sup>1</sup>, F. SEMENT<sup>1</sup>, M. BERTHET<sup>1</sup>, M. BRIARD<sup>1</sup>,  
L. HAMAMA<sup>1</sup>, P. POUPARD<sup>2</sup> and R. BERRUYER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Agrocampus Ouest Centre d'Angers - INHP, IFR Quasav 149, UMR GenHort 1259,  
2 rue Le Nôtre, 49045 Angers Cedex 01, France.

<sup>2</sup>Université d'Angers, IFR Quasav 149, UMR PaVé A77, UFR Sciences,  
2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex 01, France.

<sup>3</sup>Université d'Angers, IFR Quasav 149, UMR GenHort 1259, UFR Sciences,  
2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex 01, France.

### INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Carrot (*Daucus carota* L. subsp. *sativus*) is one of the most popular and commonly consumed vegetables worldwide. This biannual plant is also the most economically important species in the *Apiaceae* family, at the same time in vegetable production and seed production, where France is the first producer worldwide.

Alternaria leaf blight, the most common and destructive foliage disease of carrot, is mainly due to *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko. This fungus is a leaf necrotrophic pathogen on carrot, and its sources of inoculum are numerous, including infected carrot seeds. Symptoms of the disease begin with small dark-brown lesions surrounded by a chlorotic halo. Later, these lesions become coalescent giving a burnt appearance to the leaf. The entire foliage can be destroyed, thus preventing the mechanical harvest of roots by top lifting harvesters.

Different ways to protect carrots from Alternaria leaf blight are available. Standard methods are centered on chemical control, either by seed or foliar treatments. Such methods are costly and not environmentally friendly. Breeders have developed some resistant genotypes but their resistance levels are not sufficient yet to effectively control the disease without chemical applications. In order to obtain better resistance levels, it is critical to gain a better understanding of the genetic determinism of resistance.

Carrot resistance to *Alternaria dauci* is multigenic. Partially resistant carrot cultivars exist, but no complete resistance has ever been observed. A previous study in our lab (Le Clerc *et al.*, 2009) confirms this multigenic control and resistance QTLs have been found. However mechanisms underlying the observed variation remain unknown. More generally, little is known about the molecular mechanisms underlying plant partial resistance QTLs. In numerous papers (recent examples include Loarce *et al.*, 2009 in oat and Liu *et al.*, 2011 in rice), colocalisation of NBS-LRR sequences and partial resistance QTLs is looked for, under the assumption that partial resistance would result from overcome NBS-LRR-like resistance genes. Another classical hypothesis is that genes underlying partial resistance QTLs are involved in defense mechanisms (Hu *et al.*, 2008; Manosalva *et al.*, 2009).

The defense-related signaling system is based on two main pathways: the salicylic acid (SA) pathway, and the jasmonic acid (JA) pathway. In a very simplified way, these pathways are antagonistic; SA pathway is activated in response to biotrophic

pathogens, while JA pathway is activated by attacks from necrotrophic pathogens such as *Alternaria dauci* (Glazebrook, 2005). *A. thaliana* studies showed that interactions existing between these two pathways are remarkably complex. Moreover, JA and the wound-induced ethylene pathway also interact, in a more agonistic fashion.

In our study, we hypothesize that the jasmonic acid pathway genes are involved in the observed resistance reactions. In order to test this hypothesis, we have developed a candidate gene approach based on sequence homology. Since carrot is a non-model plant with only scarce sequence data available, this approach had to be based on a degenerate primer based cloning strategy.

## MATERIAL AND METHODS

### Conserved sequences detection

Highly conserved areas were searched among JA related genes (LOX2, AOS, AOC, PAL, JAR1, JAZ3, COI1, MYC2, MPK4, CHI-B, PR4-HEL, GLP, PR12-PDF1,2, VSP1, PR13-THI2,1, PR5-TLP, NINJA). Meanwhile, the same strategy was used for two genes linked to the two other known defense signaling pathways, salicylic acid (PR1) and ethylene (ERF2).

For each gene, amino acid sequences from seven dicotyledonous species (*Arabidopsis thaliana*, *Heliantus annuus*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum*, *Populus trichocarpa*, *Solanum tuberosum* and *Vitis vinifera*) were retrieved from public databases using BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences were aligned using CLUSTAL W software, and highly conserved areas were looked for.

### Degenerate primer design

For each gene, two conserved areas were selected. Degenerate primers were designed with three main constraints: (i) A 50-500 aa (150-1500 nt) spacing between them (ii) a degeneration level lower than 100 and (iii) similar melting temperatures within the 50°C - 60°C range.

### DNA extraction and amplification

Genomic DNA used in this study was extracted from fresh carrot leaves (Presto cultivar) as described in Hoisington *et al.* (1994). PCR amplifications were performed using one unit of UptiTherm DNA polymerase (Interchim, Montluçon, France) and 200 µM of dNTP (Amresco, Solon, OH, USA). PCR cycles were performed as following on a C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA): 94°C during 3 min, 30 cycles of 94°C during 30 s - 55°C during 30 s - 72°C during 1 min, finally 72°C during 7 min. Several parameters of this amplification step were adjusted depending on the specificity of observed amplifications: primers and DNA concentrations, cycle number, annealing temperature and elongation phase length. Satisfactory amplicons, e.g. those showing a single band, were cloned into the pGEM®-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA). DH10B™ cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were transformed with ligations by electroporation. SP6 - T7 - PCR amplified inserts were then sent to GATC Biotech (Konstanz, Germany) for sequencing. Sequence data were then used to check specificity of cloning and the presence of introns.

## RESULTS AND DISCUSSION

In this paper, annealing temperature and primer concentration, along with the use of touch-down cycles in certain cases, were the variables that were the most critical in obtaining specific amplification. Specificity of amplification was checked by aligning translated carrot sequences.

These alignments also highlighted putative introns in some of the cloned gene sequences (see table 1). In every case, the putative intron was flanked with specific intron border sequences. For each gene, we chose to sequence several pGEM-T clones. Since the cultivar used, Presto, is a commercial hybrid, SNPs are expected to be found. Indeed, confirmed SNPs were found in several cases.

**Table 1.** Jasmonic acid pathway genes or jasmonic acid controlled defense genes partially cloned and sequenced on carrot genome.

Genes	Intron	Multicopy
PAL	No	Yes
JAR1	No	No
COI1	Yes	No
GLP	Yes	Yes
ERF2	No	Yes
PR4-HEL	Yes	Yes
PR1	No	No

Degenerate primer use is generally tricky, with a success rate barely reaching 50 % in most studies. In a recent example on a large set (Chenuil *et al.*, 2010), success rate plummeted below 40% when both primers were degenerate. The existence and extent of conserved sequences, the varying level of redundancy of the amino acids present in these sequences, and the gene copy number, are factors that strongly impact amplification efficiency and specificity. This is a reason why each degenerate primer pair needs a specific PCR optimization process.

We can present our results in a quantitative way for each stage of the cloning process: alignments of sequence data from already sequenced plant species were performed for seventeen JA pathway-related genes. Degenerate primers could be designed for thirteen of those genes. Six genes were partially cloned and sequenced (Table 1). Additionally, we successfully amplified specific carrot sequences for one SA-regulated defense gene: PR1.

Now, two strategies are deployed to link these defense related genes with partial resistance QTLs observed in the carrot-*Alternaria dauci* interaction. It is possible that different levels of resistance are linked with a non-synonymous polymorphism among these sequences. Existence of SNPs differentiating the resistant and susceptible parents of our mapping populations will be checked in order to help us find putative QTL-candidate co-localizations. It is also possible that some QTLs correspond to genes that up or down-regulate parts of the JA pathway, and thus influence expression of defense-related genes rather than the efficiency of the cognate PR proteins. In order to test this alternative hypothesis, we also plan to study, the induction of these genes by *Alternaria dauci* in both susceptible and resistant backgrounds, using Q-PCR.

REFERENCES

- CHENUIL A., HOAREAU T.B., EGEA E., PENANT G., ROCHER C., AURELLE D., MOKHTAR-JAMAI K., BISHOP J.D.D., BOISSIN E., DIAZ D., KRAKAU M., LUTTIKHUIZEN P.C., PATTI, F.P., BLAVET, N., MOUSSET S. (2010). An efficient method to find potentially universal population genetic markers, applied to metazoans. *BMC Evol Biol* **10**: 276.
- GLAZEBROOK J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**:205-227.
- HOISINGTON D., KHAIRALLAH M. & GONZALEZ-DE-LEON D. (1994). Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. 2<sup>nd</sup> edition. CIMMYT, Mexico.
- HU K.M., QIU D.Y., SHEN X.L., LI Y-H. & WANG S.P. (2008). Isolation and manipulation of Quantitative Trait Loci for disease resistance in rice using a candidate gene approach. *Mol Plant* **1**: 786-793.
- LE CLERC V., PAWELEC A., BIROLLEAU-TOUCHARD C., SUEL A. & BRIARD M. (2009). Genetic architecture of factors underlying partial resistance to *Alternaria* leaf blight in carrot. *Theor Appl Gen* **118**: 1251-1259.
- LIU Y., ZHU X.Y., ZHANG S., BERNARDO M., EDWARDS J., GALBRAITH DW., LEACH J., ZHANG G., LIU B. & LEUNG H. (2011). Dissecting quantitative resistance against blast disease using heterogeneous inbred family lines in rice. *Theor Appl Genet* **122**:341-353.
- LOARCE Y., SANZ M.J., IRIGOYEN M.L., FOMINAYA A. & FERRER E. (2009). Mapping of STS markers obtained from oat resistance gene analog sequences. *Genome* **52**: 608-619.
- MANOSALVA P.M., DAVIDSON R.M., LIU B., ZHU X., HULBERT S.H., LEUNG H. & LEACH J.E. (2009). A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiol* **149**: 286-296.

Keywords: Degenerate oligonucleotides PCR, homology cloning, PR proteins, partial resistance, QTLs.

## Annexe 11 : Listes des travaux et publications

### ▪ Publications

BOEDO C., BERRUYER R., LECOMTE M., BERSIHAND S., BRIARD M., LE CLERC V., SIMONEAU P. et POUPARD P. (2010). Evaluation of different methods for the characterization of carrot resistance to the alternaria leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*) revealed two qualitatively different resistances. *Plant Pathology* **59**: 368–375.

LECOMTE M., ALENDA C., SEMENT F. M., BERTHET M., BRIARD M., POUPARD P. et BERRUYER R. (2011). Exploring plant defense pathways in the carrot-*Alternaria dauci* pathosystem, a non-model interaction. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* **76**: 587-590.

BOEDO C., BENICHOUS S., BERRUYER R., BERSIHAND S., DONGO A., SIMONEAU P., LECOMTE M., BRIARD M., LE CLERC V. et POUPARD P. (2012). Evaluating aggressiveness and host range of *Alternaria dauci* in a controlled environment. *Plant Pathology* **61**: 63–75.

LECOMTE M., BERRUYER R., HAMAMA L., BOEDO C., HUDHOMME P., BERSIHAND S., ARUL J., N'GUYEN G., GATTO J., GUILLET D., RICHOMME P., SIMONEAU P., BRIARD M., LE CLERC V. et POUPARD P. (2012). Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and falcarindiol on development of the fungal leaf blight pathogen *Alternaria dauci*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **80**: 58–67.

### ▪ Communications orales

LECOMTE M. (2011a). Exploring plant defense pathways in the carrot-*Alternaria dauci* pathosystem, a non-model interaction. In : 63rd International Symposium on Crop Protection, 24 mai 2011, Ghent, Belgium.

LECOMTE M. (2011b). Implication des gènes de la voie de l'acide jasmonique dans la résistance de la carotte face à *Alternaria dauci*. In : Journées Jeunes Chercheurs du DGAP INRA, 06 octobre 2011, Angers, France.

LECOMTE M. (2011c). Exploring plant defense pathways in the carrot-*Alternaria dauci* pathosystem. In : 1ères Journées Scientifiques École Doctorale VENAM, 20 octobre 2011, Angers, France.

LECOMTE M. (2011d). Analyse des mécanismes de défense de la carotte face à *Alternaria dauci*. In : Journée des Doctorants de l'IFR Quasav, 17 novembre 2011, Angers, France.

### ▪ Communications affichées

CASSE N., HARDIVILLIER Y., PRADIER E., LECOMTE M., RENAUDIN S., CHENAIS B. et MORANT-MANCEAU A. (2006). *Mariner*-like elements in some marine diatoms. In : 14e Colloque Éléments Transposables, 03 juillet 2006, Clermont-Ferrand, France.

CLOTAULT J., LECOMTE M., PELTIER D., BRIARD M. et GEOFFRIAU E. (2009). Polymorphism of carotenoid biosynthesis pathway genes in different coloured carrots. In : 33rd International Carrot Conference, 18 janvier 2009, Anaheim, CA, USA.

BOEDO C., BERRUYER R., LECOMTE M., BERSIHAND S., BRIARD M., LE CLERC V., SIMONEAU P. et POUPARD P.

## Annexe 11 : Listes des travaux et publications

(2009). Comment mesurer la résistance quantitative? Comparaison de différentes méthodes. *In* : 7e Colloque National de la Société Française de Phytopathologie, 08 juin 2009, Lyon, France.

LECOMTE M., BOEDO C., BERSIHAND S., HAMAMA L., JOUBERT A., CALMES B., LE CLERC V., HUDHOMME P., POUPARD P., BRIARD M., SIMONEAU P. et BERRUYER R. (2010). La phytoalexine 6-méthoxymelléine est-elle impliquée dans les mécanismes de résistance de la carotte à *Alternaria dauci*, agent de la brûlure foliaire ? *In* : Journées Jean Chevaugeon, 25 janvier 2010, Aussois, France.

LECOMTE M., HAMAMA L., BOEDO C., HUDHOMME P., BERSIHAND S., N'GUYEN G., BRIARD M., SIMONEAU P., LE CLERC V., POUPARD P. et BERRUYER R. (2012a). Effets inhibiteurs de la phytoalexine 6-méthoxymelléine sur le développement d'*Alternaria dauci*, agent de la brûlure foliaire de la carotte. *In* : Journées Jean Chevaugeon, 16 janvier 2012, Aussois, France.

### ▪ Mémoires universitaires

LECOMTE M. (2005). *Recherche d'éléments transposables de type Mariner chez des microalgues marines*. Rapport de stage de Maîtrise de Biologie Cellulaire. Université du Maine, Le Mans, 27 p.

LECOMTE M. (2006). *Identification de marqueurs moléculaires liés à la résistance à l'helminthosporiose chez le blé tendre*. Rapport de stage de Master 2 de Biologie Végétale. Université d'Angers, Angers, 45 p.



## Résumé

La carotte, légume racine le plus consommé au monde, voit sa production fortement impactée par diverses maladies dont la brûlure foliaire. Cette maladie, provoquée par le champignon nécrotrophe *Alternaria dauci*, est considérée comme la plus préjudiciable des maladies foliaires de la carotte. Développer des variétés présentant un niveau de résistance fort et durable à cette maladie est l'un des objectifs principaux des sélectionneurs, notamment en cumulant différentes résistances partielles dans un même génotype. Afin d'optimiser un tel cumul, il est nécessaire de comprendre les mécanismes associés à ces résistances.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié l'implication de métabolites de défense produits par la carotte dans la résistance partielle de la plante à *A. dauci*. Nous avons montré un effet inhibiteur de la 6-méthoxymelléine (6-MM) et du faltarindiol, sur le développement du champignon. Cet effet est plus important avec le faltarindiol. De plus, la teneur en faltarindiol est supérieure chez le génotype résistant (Boléro) en comparaison avec le génotype sensible (Presto) et, suite à l'inoculation de la plante par *A. dauci*, la 6-MM s'accumule de façon plus importante dans les feuilles du génotype résistant. Ces molécules de défense pourraient ralentir le développement du champignon et participer ainsi à la résistance.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'effet de métabolites toxiques produits par le champignon sur des cultures cellulaires de carotte. Nos résultats montrent une corrélation entre le comportement des cellules traitées (viabilité cellulaire, embryogenèse somatique et activité enzymatique) et la sensibilité/résistance des génotypes évaluée au niveau de la plante entière. Parmi les génotypes les plus résistants au champignon, le génotype I2 résiste mieux à l'application d'extraits fongiques que le génotype K3. Ainsi, la résistance partielle de la carotte face à *A. dauci* semble inclure des résistances aux toxines.

Dans le dernier chapitre, nous avons recherché un lien entre la résistance partielle et les mécanismes de défense de la plante, en particulier ceux liés à la voie des jasmonates. Nos premiers résultats montrent la surexpression du gène *PR4* chez le génotype résistant K3, comparativement aux autres génotypes, y compris I2. Nous avons par ailleurs recherché des sites polymorphes (SNP) dans les séquences de quatre gènes de défense. Deux gènes (*PAL*, *GLP*) présentent un polymorphisme de séquence entre génotypes. Dans le cas de *GLP*, les SNPs mis en évidence permettent de différencier un génotype sensible (H1) du génotype K3.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer la présence d'une diversité des modalités de la résistance partielle de la carotte face à *A. dauci*. Ainsi, la résistance aux toxines semble jouer un rôle plus important chez I2 que chez K3. Inversement, la résistance de K3, et non celle de I2, semble impliquer la voie des jasmonates. Au-delà de leur application en amélioration, ces travaux jettent une lueur sur les mécanismes de la résistance partielle, mécanismes encore très peu connus, même parmi les interactions modèles.

## Mots clés

*Daucus carota*, *Alternaria dauci*, résistance partielle, métabolites antifongiques, toxines fongiques, jasmonates, gènes de défense

## Abstract

Carrot is the most widely consumed root vegetable worldwide. Carrot production is strongly impacted by various diseases, including *Alternaria* leaf blight. This disease, caused by the necrotrophic fungus *Alternaria dauci*, is regarded as the most prejudicial carrot foliar disease. An important goal for carrot breeders is the enhancement of cultivars resistance towards strong and durable levels. This enhancement implies cumulating different partial resistances in one genotype. Understanding the mechanisms of *Alternaria* leaf blight partial resistance will help developing such strategies. In order to address this question, we developed a three pronged strategy.

First, we explored the implication of carrot defense metabolites in partial resistance towards *A. dauci*. We showed that falcarindiol had a stronger inhibiting effect on fungal growth than 6-methoxymellein (6-MM). Moreover, there is more falcarindiol, and 6-MM accumulates more strongly after inoculation in the resistant genotype (Bolero) than in the susceptible one (Presto). These defense molecules could slow down the fungus development and thus take part in resistance.

In one second part, we explored plant cell resistance towards fungal metabolites. This resistance, tested in liquid cultures amongst several cultivars (cell viability, somatic embryogenesis and enzymatic activity), shows a good correlation with the resistance levels of whole plants towards the fungus. Disease resistant genotypes showed moderate (K3) to strong (I2) fungal metabolites resistance. Thus, carrot *Alternaria* blight resistance mechanisms seem to include toxin resistances.

In the final chapter, we explored the role of defense mechanisms in carrot partial resistance. Our first results indicate the implication of the jasmonates pathway, in particular through the overexpression of the *PR4* gene in the resistant genotype K3, but not I2. In addition we explored polymorphic sites (SNP) in the sequences of four defense genes. Two genes (*PAL*, *GLP*) have a sequence polymorphism between genotypes. In the case of *GLP*, the SNPs highlighted allow to differentiate a susceptible genotype (H1) from the K3 genotype.

During this work, we uncovered different aspect of carrot partial resistance. In particular we can hypothesize that two genotypes (I2 and K3), reach an equivalent partial resistance level, through two quite distinct mechanisms. Beyond the use for a faster breeding of carrot for resistance, these results have more basic implications, as partial resistance mechanisms are still poorly understood, including model plant pathogen interactions.

## Key words

*Daucus carota*, *Alternaria dauci*, partial resistance, antifungal metabolites, phytotoxins, jasmonates, defense genes



# Thèse de Doctorat

**Mickaël LECOMTE**

**Analyse des mécanismes de défense de la carotte (*Daucus carota*) face au champignon pathogène *Alternaria dauci*, responsable de l'alternariose ou brûlure foliaire**

## Résumé

La carotte, légume racine le plus consommé au monde, voit sa production fortement impactée par diverses maladies dont la brûlure foliaire. Cette maladie, provoquée par le champignon nécrotrophe *Alternaria dauci*, est considérée comme la plus préjudiciable des maladies foliaires de la carotte. Développer des variétés présentant un niveau de résistance fort et durable à cette maladie est l'un des objectifs principaux des sélectionneurs, notamment en cumulant différentes résistances partielles dans un même génotype. Afin d'optimiser un tel cumul, il est nécessaire de comprendre les mécanismes associés à ces résistances.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié l'implication de métabolites de défense produits par la carotte dans la résistance partielle de la plante à *A. dauci*. Nous avons montré un effet inhibiteur de la 6-méthoxymelléine (6-MM) et du faltarindiol, sur le développement du champignon. Cet effet est plus important avec le faltarindiol. De plus, la teneur en faltarindiol est supérieure chez le génotype résistant (Boléro) en comparaison avec le génotype sensible (Presto) et, suite à l'inoculation de la plante par *A. dauci*, la 6-MM s'accumule de façon plus importante dans les feuilles du génotype résistant. Ces molécules de défense pourraient ralentir le développement du champignon et participer ainsi à la résistance.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'effet de métabolites toxiques produits par le champignon sur des cultures cellulaires de carotte. Nos résultats montrent une corrélation entre le comportement des cellules traitées (viabilité cellulaire, embryogenèse somatique et activité enzymatique) et la sensibilité/résistance des génotypes évaluée au niveau de la plante entière. Parmi les génotypes les plus résistants au champignon, le génotype I2 résiste mieux à l'application d'extraits fongiques que le génotype K3. Ainsi, la résistance partielle de la carotte face à *A. dauci* semble inclure des résistances aux toxines.

Dans le dernier chapitre, nous avons recherché un lien entre la résistance partielle et les mécanismes de défense de la plante, en particulier ceux liés à la voie des jasmonates. Nos premiers résultats montrent la surexpression du gène *PR4* chez le génotype résistant K3, comparativement aux autres génotypes, y compris I2. Nous avons par ailleurs recherché des sites polymorphes (SNP) dans les séquences de quatre gènes de défense. Deux gènes (*PAL*, *GLP*) présentent un polymorphisme de séquence entre génotypes. Dans le cas de *GLP*, les SNPs mis en évidence permettent de différencier un génotype sensible (H1) du génotype K3.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer la présence d'une diversité des modalités de la résistance partielle de la carotte face à *A. dauci*. Ainsi, la résistance aux toxines semble jouer un rôle plus important chez I2 que chez K3. Inversement, la résistance de K3, et non celle de I2, semble impliquer la voie des jasmonates. Au-delà de leur application en amélioration, ces travaux jettent une lueur sur les mécanismes de la résistance partielle, mécanismes encore très peu connus, même parmi les interactions modèles.

## Mots clés

*Daucus carota*, *Alternaria dauci*, résistance partielle, métabolites antifongiques, toxines fongiques, jasmonates, gènes de défense