



**HAL**  
open science

# Analyse fonctionnelle et étude de la régulation de gènes candidats sous-jacents au QTL GpaVspl impliqué dans la résistance au nématode à kyste *Globodera pallida* chez la pomme de terre

Patricio Salvador Castro Quezada

## ► To cite this version:

Patricio Salvador Castro Quezada. Analyse fonctionnelle et étude de la régulation de gènes candidats sous-jacents au QTL GpaVspl impliqué dans la résistance au nématode à kyste *Globodera pallida* chez la pomme de terre. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2013. Français. NNT : 2013AVIG0653 . tel-00991628

**HAL Id: tel-00991628**

**<https://theses.hal.science/tel-00991628v1>**

Submitted on 15 May 2014

**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

Présentée pour obtenir le grade de **Docteur en sciences** de l'université d'Avignon et  
des pays de Vaucluse  
**Spécialité: Sciences Agronomiques**

### **Analyse fonctionnelle et étude de la régulation de gènes candidats sous-jacents au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* impliqué dans la résistance au nématode à kyste *Globodera pallida* chez la pomme de terre**

par **Patricio CASTRO-QUEZADA**

Directrice de thèse : Véronique Lefebvre

Soutenue publiquement le 31 mai 2013, devant le jury composé de

Mme Diana Fernandez	Directrice de recherche, IRD	Rapporteur
M. Philippe Castagnone-Sereno	Directeur de recherche, INRA	Rapporteur
M. Marc Bardin	Chargé de recherche, INRA (HDR)	Examineur
Mme. Frédérique Arousseau	Responsable sélection, Comté Nord	Examineur
M. Jawad Aarouf	Maître de conférences, UAPV	Co-encadrant
M. Bernard Caromel	Ingénieur d'études, INRA	Co-encadrant

---

#### **Ecole doctorale**

ED 536 Sciences et Agrosiences, Université d'Avignon et de Pays de Vaucluse

#### **Laboratoire**

INRA-UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes  
CS60094, F84143 Montfavet Cedex  
Centre INRA PACA Avignon-Montfavet-France

## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury Diana Fernandez, Philippe Castagnone-Sereno, Frédérique Arousseau et Marc Bardin pour le temps et l'intérêt qu'ils ont dédiés à l'évaluation de ce travail.

Je voudrais ensuite remercier grandement Véronique Lefebvre, Directrice de Thèse et aujourd'hui Directrice de l'Unité de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir permis de conclure mon travail dans les meilleures conditions.

Je remercie également chaleureusement Bernard Caromel pour son encadrement scientifique, pour la confiance qu'il m'a accordé durant ces trois années et pour sa participation active à mon travail

Un très grand merci à Jawad Aarouf de m'avoir accompagné et conseillé tout au long de la durée de la thèse et pour son aide précieuse dès les premiers instants.

Je suis particulièrement reconnaissant de l'accueil que j'ai reçu au laboratoire de Rennes de la part de Sylvain Fournet, Lionel Renault, Josselin Montarry et Eric Grenier. Merci à tous pour cette ambiance conviviale et pour la richesse des échanges scientifiques et humains.

J'exprime ma gratitude envers Marie-Claire Kerlan, Bruno Favery, Jean Luc Verdeil et Christophe Robaglia pour leurs précieux conseils lors de mes comités de thèse et pour les discussions qui ont suivi.

Je remercie également Geneviève Conejero pour sa patience et ses précieux conseils lors de l'utilisation du microscope confocal.

Je voudrais remercier grandement Mathilde Causse pour m'avoir accueilli dans l'Unité. Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont généreusement aidé et ont grandement contribué à l'avancée de mes travaux de recherche.

Je pourrais citer : Anne Massire, Anne Roig, Alexandre Bachellez, Vincent Ritenner, Céline Vandecastelle, Fabrice Flamain, Nasradin Touhami et Claudie Arliaud. Rebecca Stevens et Pascale Caromel, qui m'ont donné des coups de main en anglais et français. Enfin,

un grand merci à Cécile Garchery pour son aide pour la RT-qPCR, les observations au confocal et surtout pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je souhaite exprimer aussi toute ma reconnaissance aux personnes avec qui ont rendu mon quotidien en France agréable, notamment André Moretti, Sophie Ewert, Lénaïc Belliot, Séverine Lacombe, Lia Arraiano, Noé Gest, Bruno Savio et Manzoor Ali Abro. Ces moments partagés avec eux resteront parmi mes meilleurs souvenirs en France.

Bien sûr, dans cette petite liste, il m'est impossible de citer toutes les personnes à qui je souhaite exprimer ma profonde gratitude, pour leur soutien, infime ou immense, mais toujours précieux.

## Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction bibliographique</b>	<b>3</b>
1.1. Les nématodes	3
1.1.1. Généralités	3
1.1.2. Taxinomie	3
1.1.3. Les nématodes à kyste ( <i>Globodera</i> sp)	4
1.1.3.1. Cycle de développement	5
1.1.3.2. Gamme d'hôtes, dégâts et symptômes	6
1.1.4. Gènes impliqués dans l'interaction plante-nématode	7
1.1.4.1. Stratégies d'identification des gènes impliqués	7
1.1.4.2. Gènes de plante impliqués dans les interactions compatibles	8
1.1.4.3. Gènes de plante impliqués dans les interactions incompatibles	10
1.1.4.4. Gènes de nématodes impliqués dans l'initiation du site nourricier	11
1.1.5. La lutte génétique contre les nématodes à kyste chez la pomme de terre	11
1.1.5.1. Les sources de résistance à <i>Globodera pallida</i> chez la pomme de terre	12
1.1.5.2. Cartographie de gènes et de QTL de résistance	13
1.1.5.3. Les résistances artificielles	16
1.1.6 Les gènes de résistance aux nématodes clonés	17
1.2. Le système immunitaire des plantes	19
1.2.1. L'immunité déclenchée par des PAMP (PTI)	20
1.2.2 L'immunité déclenchée par des effecteurs (ETI)	21
1.2.2.1. Le modèle « gène pour gène » de Flor	21
1.2.2.2. ETI	21
1.2.3. Structure des différents gènes de résistance	22
1.2.3.1. Les protéines RLP et RLK	22
1.2.3.2. Les protéines NBS-LRR	22
1.2.4. Origine des gènes NBS-LRR	24
1.2.5. Reconnaissance directe et indirecte d'une protéine Avr du pathogène	25
1.2.5.1. Reconnaissance directe : modèle récepteur-ligand	25
1.2.5.2. Reconnaissance indirecte : le modèle de garde	26
1.2.5.3. Reconnaissance indirecte : le modèle de leurre (decoy)	27
1.2.6. Interactions intramoléculaires	27

1.2.7. Les protéines NBS-LRR font partie de complexes protéiques	29
1.2.7.1. La protéine EDS1 est nécessaire aux résistances médiées par les gènes TIR-NBS-LRR	29
1.2.7.2. Les protéines chaperones HSP90-RAR1-SGT	30
1.2.7.3. Plusieurs NBS-LRR peuvent être nécessaires pour la résistance	30
1.2.7.4. Oligomérisation de protéines NBS-LRR	31
1.2.8. Localisation subcellulaire des protéines NBS-LRR	32
1.2.9. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes NBS-LRR	33
1.2.10. Autres rôles des gènes NBS-LRR que dans la résistance	34
1.3. Etat des travaux à mon arrivée dans l'équipe RDS pour le pathosystème pomme de terre-nématodes	35
1.4. Le locus comportant les deux gènes candidats TNL et mTERF sous-jacents au QTL <i>GpaV<sub>spl</sub></i> est dupliqué chez <i>S. phureja</i> et <i>S. sparsipilum</i>	37
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	<b>38</b>
2.1. Matériel végétal	38
2.2. Populations de <i>G. pallida</i>	38
2.3. Transformation génétique	38
2.3.1. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
2.3.2. Mise en culture d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
2.3.3. Transformation des explants de pomme de terre	39
2.4. Tests de résistance à <i>G. pallida</i>	39
2.4.1. Dispositif expérimental utilisé lors du test de résistance in vitro	39
2.4.1.1. Préparation des plantes à inoculer	39
2.4.1.2. Préparation des juvéniles J2 de <i>G. pallida</i> et inoculation	40
2.4.1.3. Evaluation du niveau de résistance des plantes inoculées	40
2.4.2. Dispositif expérimental utilisé lors du test de résistance en pot	41
2.5. Observations macro et microscopiques	41
2.5.1. Coloration des nématodes à la fuchsine acide	41
2.5.2. Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie photonique	42
2.5.3. Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie à épifluorescence	42
2.5.4. Observation en microscopie confocale et multiphotonique	43
2.6. Analyses moléculaires	43
2.6.1. Extraction d'ADN	43

2.6.2. PCR	43
2.6.2.1. Vérification de la présence de l'ADN de transfert issu du vecteur pBIN19	43
2.6.2.2. Amplification du promoteur du gène Spl_TNL18428	44
2.6.3. Construction du vecteur portant la construction promoteur Spl_TNL18428 ::GFP	45
2.6.4. PCR Quantitative	45
2.7. Analyses statistiques	46
<b>Chapitre 3 : Analyses fonctionnelles des gènes candidats TIR-NBS-LRR et mTERF localisés au locus <i>GpaV<sub>spl</sub></i></b>	<b>47</b>
3.1. Analyse fonctionnelle du gène Spl_TNL18428	47
3.1.1. Analyse fonctionnelle par complémentation des plantes sensibles avec le gène Spl_TNL18428	48
3.1.1.1 Transformation génétique	48
3.1.1.2 Mise au point du test de résistance in vitro	48
3.1.1.3. Test de résistance in vitro	50
3.1.1.4. Test de résistance en pot	51
3.1.2. Analyse fonctionnelle par extinction de l'expression de gènes candidats TIR-NBS-LRR dans des plantes résistantes	52
3.2. Analyse fonctionnelle du gène Spl_mTERF18430 localisé au QTL <i>GpaV<sub>spl</sub></i>	53
3.3. Conclusions	53
<b>Chapitre 4 : Régulation des gènes candidats Spl_TNL18428 et Spl_TNL18429 localisés au locus <i>GpaV<sub>spl</sub></i></b>	<b>56</b>
4.1 Comparaison des séquences des deux gènes Spl_TNL18428 et Spl_TNL18429 localisés au locus <i>GpaV<sub>spl</sub></i>	56
4.1.1. Comparaison des séquences	57
4.1.2. Définition d'amorces spécifiques de chaque TNL	57
4.2. Mesure du niveau d'expression des gènes Spl_TNL18428 et Spl_TNL18429 localisés au locus <i>GpaV<sub>spl</sub></i>	58
4.2.1. Des gènes de référence sont nécessaires pour normaliser l'expression des gènes candidats	58
Article « Identification of reference genes for normalizing RNA expression in potato roots infected with cyst nematodes	59

4.2.2. Expression différentielle des gènes Spl_TNL18428 et Spl_TNL18429	72
4.3. Localisation tissulaire de l'expression du gène Spl_TNL18428	73
4.3.1. Clonage et l'analyse bioinformatique de la séquence du promoteur Spl_TNL18428	73
4.3.2. Localisation tissulaire de l'activité du promoteur Spl_TNL18428 dans des racines infectées par des nématodes	74
4.4. Conclusions	75
<b>Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives</b>	<b>77</b>
5.1. Quel est ou quels sont le(s) gène(s) sous-jacent(s) au QTL <i>GpaV<sub>spl</sub></i> ?	77
5.2 Comment les gènes TIR-NBS-LRR localisés au locus <i>GpaV<sub>spl</sub></i> sont-ils exprimés ?	82
5.3. Comment peut-on expliquer la résistance conférée par le locus <i>GpaV<sub>spl</sub></i> ?	86
5.4. Perspectives	87
<b>6. Références bibliographiques</b>	<b>90</b>
<b>7. Annexes</b>	<b>114</b>
Annexe 1 : Milieu SOC	114
Annexe 2 : Milieu Luria Broth (LB)	115
Annexe 3 : Coloration PAS/Naphtol Blue Black	115



## Liste de figures

### Chapitre 1

Figure 1.1 : Représentation schématique de l'évolution du phylum Nematoda, basée sur la séquence complète de la SSU rDNA.

Figure 1.2 : Cycle de développement des nématodes à kyste.

Figure 1.3 : Faible croissance des plantes de pomme de terre due à l'attaque du nématode à kyste *G. pallida*.

Figure 1.4 : Structures et localisation de quelques gènes de résistance aux nématodes caractérisés au niveau moléculaire.

Figure 1.5 : Le système immunitaire des plantes. Modèle zig-zag-zig appliqué aux interactions plantes-nématodes.

Figure 1.6 : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) connus chez les plantes.

Figure 1.7 : Représentation schématique des domaines trouvés dans les protéines de résistance comportant un domaine LRR, chez les plantes.

Figure 1.8 : Les récepteurs NBS-LRR peuvent reconnaître des effecteurs de pathogènes soit par des mécanismes d'interactions directes, soit par des mécanismes d'interactions indirectes.

Figure 1.9 : Paires de gènes NBS-LRR nécessaires à l'expression d'une résistance.

Figure 1.10 : Modèle proposé pour l'activation de protéines TIR-NB-LRR.

Figure 1.11 : Atterrissage chromosomique sur les séquences de clones BAC disponibles dans les bases de données en 2009.

Figure 1.12 : Structure intron-exon du gène TNL localisé au locus *GpaV<sub>spl</sub>*, déterminée par RT-PCR et RACE.

Figure 1.13 : Le locus *GpaV* est dupliqué chez *S. phureja* et chez *S. sparsipilum*.

### Chapitre 2

Figure 2.1 : Matériel végétal utilisé dans la thèse.

### Chapitre 3

Figure 3.1 : Mise au point du test de résistance in vitro : développement des nématodes dans la chambre de culture CC14 réglée à 22°C (A) et dans le phytotron réglé à 17°C (B).

Figure 3.2 : Nématodes à différents stades de développement sur des racines de pommes de terre sensibles ou résistantes.

Figure 3.3 : Nématodes au stade J2 sur des racines de pomme de terre sensible ou résistante

Figure 3.4 : Localisation du fragment ciblé par la construction RNAi (en jaune) sur l'alignement d'une partie des exons 4 des gènes SPL\_TNL18428 et SPL\_TNL18429.

Figure 3.5 : Niveau d'expression relative des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429, normalisé avec les gènes de référence RPN7, UBP22, MST2 et OXA1 dans les plantes RNAi par rapport au témoin non transformé.

Figure 3.6 : Résultats du test de résistance en pot sur les plantes transformées par la construction ARNi ciblant le domaine LRR du gène TIR-NBS-LRR localisé au locus *GpaV<sub>spl</sub>*.

## Chapitre 4

Figure 4.1 : Position des amorces Q212 (en bleu) et Q216 (en vert) permettant d'amplifier spécifiquement les gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*.

Figure 4.2 : Niveau d'expression relative des gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*, normalisé avec les gènes de référence *RPN7*, *UBP22*, *MST2* et *OXA1* en fonction de l'allèle de résistance ou de sensibilité au QTL mineur *GpaXI<sub>spl</sub>*, en conditions inoculée (I) et non inoculée (NI), pendant une cinétique à trois points.

Figure 4.3 : Séquence du promoteur *TNL18428* et motifs putatifs agissant en *cis*.

Figure 4.4 : Localisation tissulaire de l'expression du promoteur *Spl\_TNL18428* en réponse à l'infection pour les nématodes.

## Liste de tableaux

### Chapitre 2

Tableau 2.1 : Composition du milieu « pomme de terre ».

### Chapitre 3

Tableau 3.1 : Efficacité de la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* sur différents génotypes de pomme de terre.

Tableau 3.2 : Pourcentage de nématodes développés en femelles, 21 jours après inoculation, dans les racines des plantes transformées avec le gène candidat Spl\_TNL18428 (test *in vitro*).

Tableau 3.3 : Résultats du test de résistance en pot sur les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428 sous le contrôle de son propre promoteur.

Tableau 3.4 : Résultats du test de résistance en pot sur les plantes transformées avec le gène Spl\_mTERF18430 sous le contrôle de son propre promoteur.

### Chapitre 4

Tableau 4.1 : Comparaison des séquences nucléotidiques des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429.

Tableau 4.2 : Comparaison des séquences protéiques des gènes Spl\_TNL18428, Spl\_TNL18429 et Bs4.

Tableau 4.3 : Motifs détectés dans le promoteur du gène Spl\_TNL18428 et décrits comme étant impliqués dans des interactions plantes-pathogènes.

## **Productions scientifiques**

### **Publications**

Castro-Quezada P, Aarrouf J, Claverie M, Favery B, Mugniéry D, Lefebvre V and Caromel B (2013) Identification of reference genes for normalizing RNA expression in potato roots infected with cyst nematodes. *Plant Mol Biol Rep*. DOI 10.1007/s11105-013-0566-3

Aarrouf J, Castro-Quezada P, Mallard S, Caromel B, Lizzi Y, Lefebvre V (2012) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of pepper (*Capsicum annuum*): A new and efficient tool for functional analysis. *Plant Cell Rep*. 31: 391-401

### **Communication orale**

Caromel B, Kerlan MC, Castro-Quezada P, Aarrouf J, Berges H, Mugniéry D, and Lefebvre V (2010) Chromosome landing at a quantitative trait locus involved in resistance to cyst nematode in potato NEMAGENICS, Exploiting genomics to understand plant-nematode interactions. Proceedings of the Fourth Annual Meeting, Lisbon, Portugal 24-27 May 2010

### **Communication affichée**

Castro-Quezada P, Aarrouf J, Claverie M, Grenier E, Kerlan MC, Favery B, Lefebvre V and Caromel B (2012) Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts levels in roots of potatoes infected by nematodes. Société Française de Phytopathologie, Paris (France), 5-8 June 2012

## Abréviations

ADNc	ADN complémentaire
ADNc-AFLP	ADN complémentaire-Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
ARC	<i>APAF-1, R proteins, and CED-4</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNi	Interférence par ARN
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ATP	adénosine triphosphate
Avr	Avirulence
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
CC	<i>Coiled coil</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinases</i>
EDS1	<i>Enhanced disease susceptibility 1 protein</i>
EST	Marqueur de séquence exprimée ( <i>Expressed Sequence Tag</i> )
ETI	<i>Effector-triggered-immunity</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HR	Résistance par sensibilité
JA	Acide jasmonique
J2	Juvénile de 2 <sup>me</sup> stade
LCM	<i>Laser capture microdissection</i>
LOX	Enzymes de la lipoxigénase
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
LSU rDNA	<i>Large subunit ribosomal DNA</i>
mTERF	<i>Mitochondrial transcription termination factor</i>
NBS	<i>Nucleotide-binding site</i>
NLR	Récepteur de type NOD
NOD	<i>Nucleotide-oligomerization domain</i>
PAD4	<i>Phytoalexin Deficient 4</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCD	<i>Programmed Cell Death</i>
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PTI	<i>PAMPs-triggered-immunity</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
QTL	Locus à caractère quantitatif
RAR1	<i>Required for MLA12 Resistance 1</i>
RT-qPCR	PCR Quantitative réalisée sur des ADN complémentaires
RLK	<i>Receptor-like kinase</i>
RLP	<i>Receptor-like protein</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SA	Acide salicylique
SAG101	<i>Senescence Associated Gene 101</i>
SSU rDNA	<i>Small subunit ribosomal DNA</i>
T-DNA	ADN de transfert
TIR	<i>TOLL-like receptor</i>
TLR	Récepteur de type Toll
TNL	TIR-NBS-LRR

## Liste des sites Web utilisés

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://solgenomics.net/>

<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>

<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

<http://www.leonxie.com/referencegene.php#>

<http://compbio.dfc.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>

<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/athal/>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/blast.html>

[http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)

[http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_www.cgi?rm=compare](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=compare)

## Introduction générale

Les nématodes à kyste sont parmi les bioagresseurs causant le plus de dégâts sur les cultures de pommes de terre (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*). Le contrôle des nématodes est souvent réalisé par la combinaison de plusieurs stratégies de lutte. La lutte culturale n'a qu'une efficacité limitée et la lutte chimique montre ses limites par son caractère toxique pour l'homme et l'environnement. De plus, les produits de traitements les plus efficaces sont peu à peu interdits dans tous les pays de l'Union Européenne. L'utilisation de variétés résistantes aux nématodes est alors une alternative prometteuse. Plusieurs sources de résistances aux nématodes à kyste ont été identifiées chez différentes espèces sauvages apparentées à la pomme de terre.

Dans le cadre de contrats européens, l'INRA ainsi que l'Université de Wageningen au Pays-Bas, le Max Planck Institute en Allemagne, NEIKER en Espagne et l'ex-Scottish Crop Research Institute en Ecosse, ont cartographié des QTL de résistance aux nématodes, originaires de plusieurs espèces apparentées à la pomme de terre.

La résistance trouvée chez l'accession spl88S.329.18, issue de l'espèce sauvage *Solanum sparsipilum*, est caractérisée par un déterminisme oligogénique, avec un QTL à effet fort localisé sur le chromosome V (*GpaV<sub>spl</sub>*) et un QTL à effet faible localisé sur le chromosome XI (*GpaXI<sub>spl</sub>*). Pour obtenir une résistance de haut niveau, l'effet du QTL à effet fort doit être complété par celui du QTL à effet faible. L'expression conjointe des allèles de résistance à ces 2 QTL permet à la plante de développer une nécrose au niveau de la racine infectée par le parasite, et empêche ainsi le développement du site nourricier, appelé syncytium. Les nématodes ne peuvent alors plus se nourrir correctement et moins de 1 % d'entre eux se développent en femelles, ce qui empêche le développement d'une nouvelle génération.

Lorsque j'ai initié ma thèse en novembre 2009, la cartographie fine et l'atterrissage chromosomique sur des séquences de clones BAC avaient permis de restreindre la position du QTL *GpaV<sub>spl</sub>* à une région génomique de 30 kb de *S. demissum* accessible en ligne. Deux gènes candidats y avait été annotés : un gène mTERF (*Mitochondrial transcription termination factor*) et un gène TIR-NBS-LRR (TNL). Les gènes mTERF n'ont jamais été décrits comme étant impliqués dans des réactions de résistance ou de défense, alors que les gènes NBS-LRR en général sont considérés comme des gènes classiques de résistance

puisque la majorité des gènes de résistance clonés appartiennent à cette classe de gènes. Nous nous sommes alors interrogés, d'une part, si les gènes TNL et mTERF localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* pouvaient être responsables de la résistance à *G. pallida*, et d'autre part, si le mode de régulation du gène TNL pouvait expliquer les différents niveaux de résistance observés dans différents fonds génétiques (avec ou sans le QTL mineur *GpaXI<sub>spl</sub>*). Pour répondre à ces questions, nous avons analysé l'effet de ces deux gènes candidats sur le niveau de résistance au nématode à kystes *Globodera pallida* et le mode de régulation du gène TNL grâce à des expériences de complémentation fonctionnelle de plantes sensibles et d'extinction de l'expression du gène TNL par RNAi.

Or en 2011, une première version de la séquence du génome de *S. phureja*, espèce apparentée à la pomme de terre, a été rendue publique. Par ancrage du locus *GpaV<sub>spl</sub>* à cette séquence, nous avons découvert que le couple de gènes mTERF-TNL sous-jacent au locus *GpaV<sub>spl</sub>* était dupliqué en tandem. Pour cette raison, nous avons en cours de thèse étudié partiellement la régulation du deuxième TNL.

Ce manuscrit rapporte les résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse. Il est organisé en cinq chapitres. L'introduction bibliographique (Chapitre 1) présente d'abord les nématodes à kyste à travers leur biologie et les moyens de lutte utilisés pour les combattre. Le système immunitaire des plantes et la structure des protéines de résistance sont ensuite décrits, puis l'état des travaux dans l'équipe avant mon arrivée et les informations sur le locus *GpaV<sub>spl</sub>*, issues de la séquence du génome de *S. phureja*, sont exposés.

Après avoir présenté les matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail (Chapitre 2), les résultats obtenus sont répartis en deux chapitres. L'analyse fonctionnelle des gènes candidats localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* est présentée dans le chapitre 3. Les résultats portant sur la régulation des deux gènes TNL sont présentés dans le chapitre 4, lequel est divisé en deux parties. La première partie, concernant l'identification et la validation de gènes de référence pour les études d'expression génique, fait l'objet d'un article publié dans *Plant Molecular Biology Reporter*. La deuxième partie décrit l'étude du niveau d'expression des gènes TNL par PCR quantitative et la localisation tissulaire d'un des gènes TNL, dont le promoteur a été fusionné avec le gène rapporteur GFP. Dans le chapitre 5, l'implication des résultats obtenus au cours de cette thèse est discutée et des perspectives pour la poursuite de ce travail sont présentées.



# Chapitre 1 : Introduction bibliographique

## 1.1. Les nématodes

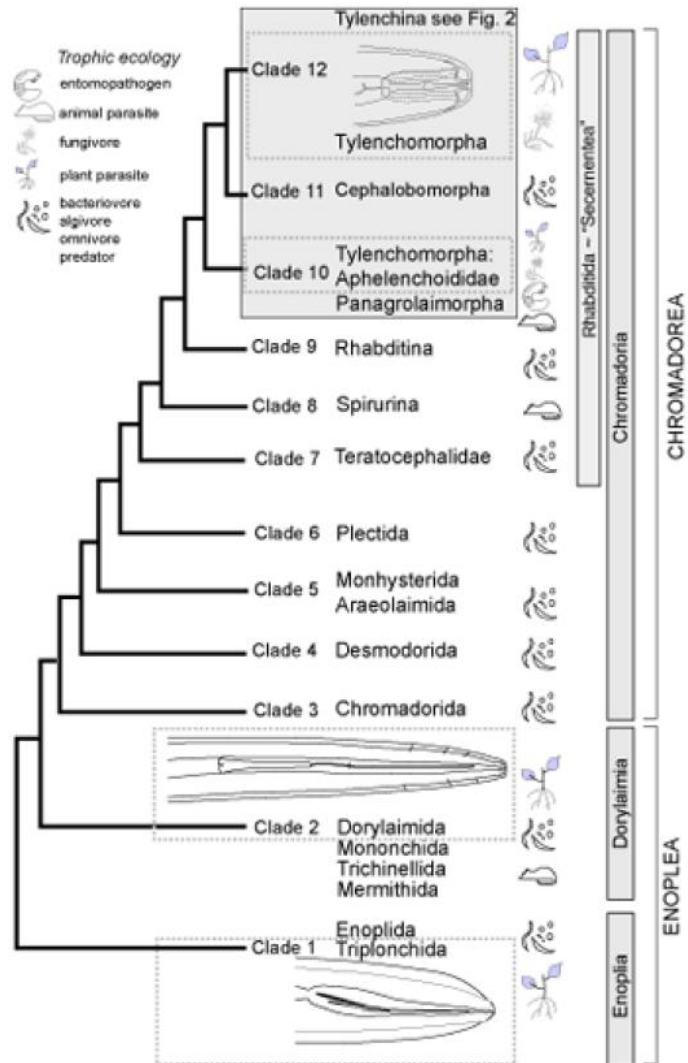
### 1.1.1. Généralités

Les nématodes sont des organismes vermiformes cylindriques non segmentés occupant des niches écologiques très diverses sur la planète. Ils comprennent différentes formes, libres ou parasites d'animaux ou de végétaux. Ils exploitent différents milieux tels que les océans, les mers, les eaux douces, les fluides corporels et les films d'eau dans le sol ou sur les végétaux. Ce sont les organismes les plus abondants de tous les métazoaires en terme de nombre d'individus dans de nombreux écosystèmes, notamment ceux du sol (Jones et al. 2011). Le nématode le mieux connu est l'espèce *Caenorhabditis elegans*, organisme modèle dont le génome a été entièrement séquencé en 1998 (*C. elegans* Consortium 1998) et dont la structure simple permet l'étude de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires. *C. elegans* a un cycle de vie court (trois jours), une taille petite (environ) et un nombre élevé de descendants. De plus, sa simplicité anatomique et génomique se prête facilement à la manipulation technique en laboratoire. *C. elegans* fournit donc un modèle puissant pour comprendre les étapes clés des nématodes phytoparasites d'intérêt agronomique (Jones et al. 2011).

Les nématodes ont également des régimes alimentaires très diversifiés. Les espèces peuvent être bactériophages (ex : *C. elegans*), entomopathogènes (ex : *Steinernema spp* ou *Heterorhabditis spp*), parasites d'animaux (ex : *Ascaris spp*, *Brugia spp* ou *Trichinella spp*) ou encore prédatrices (ex : *Mononchus spp*). Parmi toutes les espèces de nématodes décrites, seulement 15 % sont des parasites de plantes (ex : *Globodera spp*, *Meloidogyne spp*, *Pratylenchus spp*, *Ditylenchus spp*) (Blanchard 2007).

### 1.1.2. Taxinomie

Dans le règne animal, les nématodes sont classés dans l'infrarègne Bilateria, la division Protostomia et la sous division Ecdysozoa (Aguinaldo et al. 1997, Dunn et al. 2008), la superfamille Tilenchoidea, l'ordre Rhabditida, le sub ordre Tylenchina, l'infra ordre Tylenchomorpha (De Ley et Blaxter 2002). L'analyse des étiquettes de séquences transcrites (ESTs) a récemment confirmé le placement du phylum Nematoda dans le superphylum



**Figure 1.1 :** Représentation schématique de l'évolution du phylum Nematoda, basée sur la séquence complète de la petite sous unité de l'ADN ribosomal (SSU rDNA) (basé sur Holterman et al. 2006). Les lignages majeurs des parasites de plantes sont indiqués par des cadres en pointillés (Tylenchomorpha, Dorylaimida, Triplonchida) (Bert et al. 2011)

Ecdysozoa (Dunn et al. 2008), qui est un clade animal majeur proposé par Aguinaldo et al. (1997), regroupant tous les animaux qui muent.

Blaxter et al. (1998) et Aleshin et al. (1998) ont été parmi les premiers à exploiter le potentiel de la séquence complète de la petite sous unité de l'ADN ribosomal (SSU rDNA) pour résoudre les relations phylogénétiques entre les nématodes. Holterman et al. (2006) ont présenté une subdivision du phylum en 12 clades basés sur SSU rDNA (Figure 1.1). Récemment, un arbre phylogénétique basée sur les séquences de 1215 séquences de SSU rDNA a été présenté par van Megan et al. (2009). La topologie globale de cet arbre phylogénétique, couvrant un large éventail de taxons de nématodes ressemble à celle de Holterman. Il est à noter que les cadres actuels sont basés sur un seul cistron (des séquences d'ADN ribosomique SSU et / ou LSU), et les taxons marins sont fortement sous-représentés (Bert et al. 2011).

L'une des particularités du phylum Nematoda est la multitude de fois où les modes de vie parasites sont apparus. Le parasitisme des végétaux serait apparu indépendamment au moins quatre fois au cours de l'évolution dans différents ordres (Davis et al. 2000, Bird et al. 2000).

Trois clades comportent les nématodes phytoparasites (Figure 1.1). Les Triplonchida (Clade 1), les Dorylaimida (Clade 2) et les Tylenchomorpha (Clade 12). Les nématodes des clades Triplonchida et Dorylaimida causent peu de dégâts directs sur les plantes mais sont vecteurs de virus. L'infraordre Tylenchomorpha constitue l'ordre le plus important des nématodes phytoparasites à la fois en termes de nombre d'espèces, mais aussi en termes de dégâts causés aux plantes qu'ils parasitent. Elle comprend *Globodera sp.* et *Heterodera sp.* qui sont les nématodes à kyste, *Pratylenchus sp.* qui sont les nématodes à lésions et *Meloidogyne sp.* qui sont les nématodes à galles (Figure 1.1) (Bert et al. 2011).

### **1.1.3. Les nématodes à kyste (*Globodera sp.*)**

Les nématodes à kyste du genre *Globodera* sont des endoparasites sédentaires qui sont responsables de la formation de sites nourriciers complexes (syncytium) dans les racines des plantes infectées (Sobczak et Golinowski 2011). Ils sont les responsables de dégâts considérables à l'échelle de la planète sur une gamme d'hôtes quasiment restreinte aux Solanacées. Deux espèces attaquent la pomme de terre : *Globodera pallida* Stone (1972) et *Globodera rostochiensis* Wollenweber (1923). Les deux espèces sont originaires de la

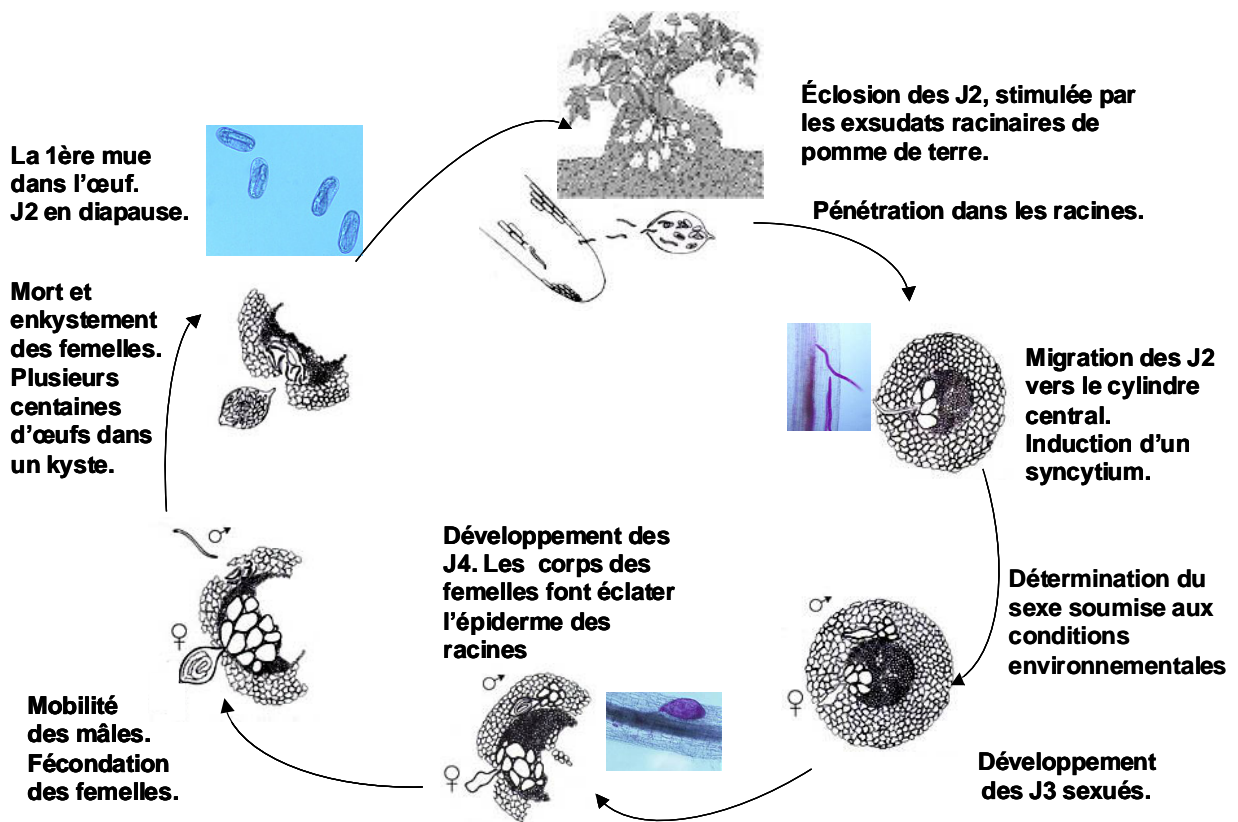


Figure 1.2 : Cycle de développement des nématodes à kyste.

Cordillère des Andes en Amérique du Sud (Evans et Stone 1977). Picard et al. (2004, 2006) ont montré une grande diversité génétique des populations de *G. pallida* péruviennes.

Actuellement, les nématodes à kyste de la pomme de terre sont considérés comme des organismes de quarantaine. La production de plants de semence de pomme de terre est uniquement autorisée dans les sols non-infectés et des mesures préventives doivent être prises. Dans les zones infestées, l'utilisation de pratiques agronomiques adéquates et le choix des génotypes résistants visent à réduire ou à empêcher la multiplication des nématodes (Chauvin et al. 2008). La lutte chimique, qui est actuellement la plus efficace contre ces organismes, est de plus en plus contestée en raison des effets polluants des nématicides sur l'environnement (Blanchard et al. 2007). De plus, ces pesticides ne sont pas sélectifs contre un seul type de pathogène et sont souvent utilisés à des doses nettement supérieures à celles utilisées contre les insectes.

#### **1.1.3.1. Cycle de développement**

Les nématodes à kyste sont des endoparasites sédentaires qui passent par 4 stades juvéniles et un stade adulte. Le cycle de développement est illustré sur la figure 1.2.

Le premier stade juvénile (J1) des nématodes à kyste se déroule à l'intérieur de l'œuf où le nématode mue pour donner un deuxième stade juvénile (J2) avant l'éclosion (Raski 1950). Lorsque la diapause est terminée, les J2 éclosent, migrent vers les racines et pénètrent au niveau de la zone d'élongation en perçant mécaniquement les cellules épidermiques et corticales avec leur stylet. Ils migrent ensuite vers l'endoderme et le cylindre central, détruisant les cellules corticales situées sur leur passage grâce à leur stylet et leurs sécrétions glandulaires. En arrivant à proximité de l'endoderme, ils testent, avec leur stylet, les cellules végétales qui les entourent avant de choisir celle qui servira à l'induction du site nourricier, appelé syncytium (Rice et al. 1985, Golinowski et al. 1996, Jones et Northcote 1972).

Le syncytium est la seule source de nutriments pour le nématode tout au long de sa durée de vie et il est formé par plus de 200 cellules fusionnées (Gheysen et Mitchum 2009). L'expansion du syncytium est assurée par la digestion des parois de nombreuses cellules adjacentes. Pendant la formation du syncytium, le cytoplasme des cellules devient dense, les vacuoles rétrécissent et les noyaux deviennent multilobés (Mugniéry et al. 1989). Les nématodes se nourrissent du cytoplasme du syncytium par l'intermédiaire d'un tube alimentaire et la phase de sédentarisation des nématodes commence.



**Figure 1.3 :** Faible croissance des plantes de pomme de terre due à l'attaque du nématode à kyste *G. pallida*.

Les J2 subiront deux mues successives, donnant des juvéniles J3 puis J4, avant de se transformer lors d'une dernière mue en adultes sexués. Les mâles filiformes redeviennent mobiles et les femelles restent en place et grossissent jusqu'à l'éclatement de l'épiderme de la racine et la libération d'un kyste. La reproduction des nématodes à kyste est strictement amphimictique (reproduction sexuée obligatoire). Le déterminisme du sexe est sous la dépendance des conditions environnementales et nutritionnelles. Le ratio mâle sur femelle est fonction des conditions d'alimentation des juvéniles J2. Lorsque les nutriments sont abondants, il y a développement d'un plus grand nombre de femelles (de l'ordre de 90 %). Lorsque les nutriments sont réduits, un plus grand nombre de mâles se développent (Betka et al. 1991, Grundler et al. 1991, Mugniéry 1996). Lors de la reproduction, la copulation déclenche la ponte des ovocytes et une femelle est généralement fécondée par plusieurs mâles. La fécondation et l'embryogenèse ont lieu dans les oviductes de la femelle. A la fin de l'embryogenèse, la femelle meurt et sa cuticule riche en tanins durcit et se transforme en kyste, protégeant ainsi entre 200 à 1200 œufs. Une première mue aura lieu dans l'œuf et les juvéniles J2 entrent en diapause, qui ne sera levée que sous l'action des exsudats racinaires de la pomme de terre (Raski 1950, Wyss 1992, Thiery 1996).

#### **1.1.3.2. Gamme d'hôtes, dégâts et symptômes**

Les différentes espèces de nématodes à kyste sont relativement spécifiques à l'hôte. Les espèces du genre *Globodera* ont une gamme d'hôte limitée à quelques espèces de la famille des Solanacées (Mugniéry et al. 1996). Ainsi, *G. pallida* et *G. rostochiensis* qui sont surtout dommageables dans les régions à climat tempéré attaquent les racines de la pomme de terre et provoquent le même type de dégâts. Ils colonisent les racines et induisent une réduction du système racinaire, limitant ainsi l'absorption de l'eau et des minéraux. Ces symptômes sont similaires à ceux induits en cas de stress hydrique, de carence minérale ou d'excès de désherbant sur la culture de pomme de terre (Mugniéry 1996) (Figure 1.3). En cas de forte infestation, le rendement peut être inférieur à la quantité de tubercules plantés et les larves en diapause, protégées par l'enveloppe du kyste, peuvent rester viables jusqu'à 15 à 20 ans dans le sol.

## **1.1.4. Gènes impliqués dans l'interaction plante-nématode**

### **1.1.4.1. Stratégies d'identification des gènes impliqués**

Lors de l'infection par les nématodes, plusieurs études ont montré des changements dans l'expression des gènes dans les racines de l'hôte, notamment dans les sites nourriciers (Gheysen et Fenoll 2002, Williamson et al. 2003). Différentes approches ont été utilisées pour étudier la réponse des plantes au parasitisme des nématodes. D'une part, nous avons les études d'expression différentielle de type « differential display » (Hermsmeier et al. 1998, 2000, Vercauteren et al. 2001), ADNc-AFLP (Qin et al. 2000, Tytgat et al. 2004, Jolivet et al. 2007), le criblage de banques différentielles (Gurr et al. 1991) et les puces à ADN (Gheysen et Fenoll 2002, Alkharouf et al. 2006, Ithal et al. 2007, Khan et al. 2004, Puthoff et al. 2003, de Boer et al. 2002a, Elling et al. 2009). D'autre part, des analyses histologiques de type hybridation in situ (Goellner et al. 2001, Niebel et al. 1993) ou fusions promoteur-gène rapporteur (Barthels et al. 1997, Favery et al. 1998, Goddijn et al. 1993, Goverse et al. 1998, Mazarei et al. 2003, 2004, Niebel et al. 1996, Puzio et al. 2000) peuvent être également utilisées.

Jusqu'à récemment, l'isolement spécifique d'ARNm du site nourricier pour la construction des banques d'ADNc était limité à la dissection manuelle ou à la microaspiration du contenu des cellules géantes ou du syncytium, induits respectivement par les nématodes à galles et les nématodes à kyste (Bird et Wilson 1994, Juergensen et al. 2003, Wang et al. 2003, Gao et al. 2001, 2003). Aujourd'hui, la technique du laser capture microdissection (LCM) est largement utilisée pour le prélèvement du contenu des cellules géantes et des syncytiums servant à la construction de banques d'ADNc (Klink et al. 2005, Ramsay et al. 2006). Cette technique permet l'isolement des ARNm de cellules cibles individuelles à l'intérieur de tissus complexes, conduisant à l'identification des gènes impliqués dans des processus biologiques spécifiques de ces cellules.

Une technique largement utilisée depuis les années 80 est l'analyse d'étiquettes de séquences exprimées (EST) (Haegeman et al. 2009, 2011, Jacobs et al. 2008, Mitreva et al. 2004, Dubreuil et al. 2007, Jones et al. 2009, Kikuchi et al. 2007, McCarter et al. 2003, Popeijus et al. 2000a, Roze et al. 2008, Vanholme et al. 2006, Gao et al. 2003). Au cours des dernières années, l'application de la génomique, par l'entremise du séquençage du génome et du transcriptome, a permis l'identification et la caractérisation fonctionnelle subséquente de nombreux effecteurs de nématodes (Haegeman et al. 2012).



#### 1.1.4.2. Gènes de plante impliqués dans les interactions compatibles

Les études de changement dans l'expression génique pour les pathosystèmes plante-nématodes se font spécialement sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, en raison de la quantité importante d'informations génomiques et de la disponibilité de lignées mutantes et de marqueurs chez cette plante (Gheysen et Fenoll 2002, Gheysen et Mitchum 2009).

Lors d'une interaction compatible, des gènes impliqués dans les réponses aux blessures et à la défense basale sont surexprimés au cours de l'infection par les nématodes. Par exemple, la fortification de la paroi cellulaire est une importante réponse de défense induite par la plante pour confiner l'agent pathogène au niveau du site d'infection. Des nombreux gènes impliqués dans ce processus, comme les extensines et les peroxydases sont surexprimés lors de l'infection par les nématodes. De même, l'accumulation des flavonoïdes, des isoflavonoïdes et d'autres composés phénoliques est une réponse de plante typique de la défense. Un grand nombre de gènes, impliqués dans les modifications des parois cellulaires ou dans la biosynthèse de métabolites secondaires, pourraient être cruciaux dans l'établissement de l'interaction plante-nématode (Gheysen et Mitchum 2009).

Certains gènes surexprimés dans les mécanismes moléculaires du cycle cellulaire ont été étudiés en détail. Les premières études sur l'expression des gènes du cycle cellulaire chez *A. thaliana* ont révélé l'induction de gènes dans les premières heures après que le nématode ait sélectionné une cellule pour initier un site nourricier. Deux kinases cyclin dépendent (*CDKAI* et *CDKB1*), une cycline de type A (*CycA2*) et une cycline mitotique (*CycB1*) sont surexprimées dans les cellules géantes ainsi que dans le syncytium (Niegel et al. 1996).

Plusieurs gènes impliqués dans les réarrangements du cytosquelette sont fortement exprimés dans les sites nourriciers de plantes attaquées par des pathogènes, par exemple les gènes de l'actine (de Almeida-Engler et al. 2004). Chez *A. thaliana*, les gènes de la tubuline sont modérément surexprimés dans le syncytium et fortement surexprimés à l'intérieur des cellules géantes (de Almeida-Engler et al. 2004).

Lors de la formation du site nourricier, un grand nombre de gènes codant des protéines qui modifient la paroi cellulaire comme les extensines sont également surexprimés au cours des interactions entre la plante et les nématodes à kyste (Ithal et al. 2007b, Khan et al. 2004, Puthoff et al. 2003). De même, une surexpression des peroxydases et des gènes impliqués dans la biosynthèse de la lignine a été observée. Les peroxydases sont des enzymes qui jouent

un rôle important dans le renforcement de la paroi cellulaire. (Goellner et al. 2001, Karczmarek et al. 2008, Vercauteren et al. 2002, Wang et al. 2007, Wieczorek et al. 2006, 2008). Des gènes codant pour des endoglucanases sont surexprimés dans des tissus radiculaires infectés soit par les nématodes à galles, soit par les nématodes à kyste, par rapport aux racines non infectées (Goellner et al. 2001, Karczmarek et al. 2008, Wieczorek et al. 2008). Plus récemment, l'expression différentielle des expansines a été observée dans des racines infectées par les nématodes à galles et les nématodes à kyste (Gal et al. 2006, Jammes et al. 2005, Puthoff et al. 2003, Wieczorek et al. 2006, Griessen et Grundler 2008, Fundali et al. 2008).

Des gènes impliqués dans la signalisation et dans le site nourricier comme les facteurs de transcription et les protéines kinases ont été trouvés sous exprimés lors des interactions plante-nématodes. Puthoff et al. (2003) ont trouvé des gènes codant pour les protéines sérine-thréonine kinases, sous-exprimés dans des racines d'*Arabidopsis thaliana* infectées par des nématodes à kyste. Plus récemment, des analyses par puces à ADN ont ajouté plusieurs gènes potentiellement importants dans la signalisation, dont l'expression était modifiée dans les sites nourriciers (Jammes et al. 2005, Khan et al. 2004, Ithal et al. 2007b).

Des hormones sont soupçonnées depuis longtemps de jouer un rôle central dans la formation du site nourricier. Pour l'auxine par exemple, le promoteur du gène *GH3* chez le trèfle blanc s'active très rapidement dans la racine, lors de l'infection par *Meloidogyne* sp. (Hutangura et al. 1999). Des taux élevés de cytokinines ont été trouvés en corrélation avec la sensibilité des plantes aux nématodes à galles (De Meutter et al. 2003, Dropkin et al. 1969).

Une troisième hormone végétale, émergeant comme un acteur dans les interactions plante-nématodes à kyste, est l'éthylène. L'éthylène est également un acteur dans les interactions plante-nématodes à kyste. Des mutants d'*A. thaliana* insensibles à l'éthylène sont moins sensibles à *H. schachtii* que des plantes de type sauvage (Wubben et al. 2001). Les mutants surproduisant de l'éthylène chez *A. thaliana* attirent plus de J2 et produisent plus de femelles (Goverse et al. 2000). Concernant les hormones qui jouent un rôle éminent dans la signalisation de la défense des plantes, comme l'acide salicylique (SA) et l'acide jasmonique (JA), des résultats contradictoires ont apparemment été obtenus (Bhattacharai et al. 2007, Wubben et al. 2008). Des recherches complémentaires sont certainement nécessaires pour comprendre le rôle de ces hormones dans les interactions plantes-nématodes.

### 1.1.4.3. Gènes de plante impliqués dans les interactions incompatibles

Des analyses d'expression des gènes à grande échelle ont été réalisées seulement pour quelques pathosystèmes comme la tomate avec les nématodes à galles (Bhattarai et al. 2007, Schaff et al. 2007), le soja avec les nématodes à kyste (Klink et al. 2007a, b 2009), le coton avec les nématodes à galles (de Deus de Barbosa et al. 2009) et la pomme de terre avec les nématodes à kyste (Jolivet et al. 2007, Sacco et al. 2009). Les gènes codant pour les enzymes de la lipoxygénase (*LOX*) ont été extrêmement induits lors de l'interaction incompatible entre le soja et *H. glycines* et la tomate et *M. javanica* (Bhattarai et al. 2007, Klink et al. 2007 a, b, 2009). De plus, des gènes *LOX* ont également été induits dans les racines de pois résistants et sous-exprimés dans les racines de plantes sensibles 48 h après l'inoculation avec *Heterodera goettingiana*, suggérant un rôle des gènes *LOX* dans la résistance (Leone et al. 2001, Veronico et al. 2006). Jolivet et al. (2007) ont trouvé des gènes surexprimés impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la régulation de la résistance et les voies de signalisation des mécanismes de défense.

Plusieurs familles de facteurs de transcription sont régulées différemment dans les interactions incompatibles entre le soja ou la tomate avec les nématodes. Il s'agit notamment de membres des familles MYB, bHLH, bZIP et WRKY. Pour les gènes correspondant aux facteurs de transcription, seulement *SlWRKY72a* et *SlWRKY72b* ont été démontrées liées à des réactions de défense chez la tomate. Ceux-ci agissent comme des régulateurs positifs de la défense basale et de la résistance médiée par le gène *Mi-1* contre les nématodes à galle, ainsi que contre les pucerons (Bhattarai et al. 2007). Des gènes codant pour des enzymes peroxydases sont régulés différemment chez le soja (Klink et al. 2007a) et chez la tomate (Bhattarai et al. 2008, Schaff et al. 2007), après l'invasion par des nématodes. Des membres de la famille multigénique des peroxydases (*Prx*) de la classe III sont impliqués dans les processus liés à la défense, telles que le dépôt de réticulation des parois cellulaires, la synthèse de phytoalexines et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Almagro et al. 2009). Plusieurs gènes *PRx* (*TaPrx111*, *TaPrx112* et *TaPrx113*) sont également régulés différemment chez les cultivars de blés résistants et sensibles à l'infection par *H. avenae*. *TaPrx112* et *TaPrx113* ont montré une induction plus élevée lors de l'interaction incompatible (Simmonetti et al. 2009).

#### **1.1.4.4. Gènes de nématodes impliqués dans l'initiation du site nourricier**

Les études de transcriptomique visant à l'identification des effecteurs de nématodes ont porté surtout sur les gènes de nématode régulés pendant le parasitisme (Elling et al. 2009, Ithal et al. 2007, Rosso et al. 2009). Le nématode utilise un mélange de différentes molécules enzymatiques pour l'établissement d'une interaction avec l'hôte. C'est du moins ce qui peut être déduit de la variété de protéines qui sont sécrétées par les glandes oesophagiennes dans les racines des plantes (De Meutter et al. 2001, Gao et al. 2003, Huang et al. 2003a, Jaubert et al. 2002).

Un peptide contenant un motif CLAVATA3/ESR (CLE) est sécrété par *H. glycines*. Il est similaire aux peptides CLE végétaux. Quand il est exprimé chez *A. thaliana*, il provoque l'arrêt prématuré du méristème apical de la tige (Wang et al. 2005). Ces résultats suggèrent que les peptides CLE sécrétés par les nématodes à kyste peuvent fonctionner comme des imitateurs de ligands de la plante hôte pour la différenciation des cellules dans les racines pendant la formation de syncytium (Lu et al. 2009).

Des effecteurs de nématodes peuvent déclencher la résistance des plantes. Par exemple, le gène *Hg-cm-1* code une chorismate mutase, dont le polymorphisme est en corrélation avec la virulence contre *H. glycines* chez le soja (Jones et al. 2003, Lambert et al. 1999). Un autre gène *Cg-1*, chez *M. incognita* a été décrit comme un gène Avr contre *Mi-1* (Gleason et al. 2008). En 2009, deux gènes de la famille SPRYSEC ont été identifiés dans les interactions incompatibles plantes-nématodes : SPRYSEC-19 et *Gp-Rbp-1* (Rehman et al. 2009a). Le gène SPRYSEC-19 a été isolé chez *G. rostochiensis* et interagit avec une protéine CC-NBS-LRR. Le gène *Gp-Rbp-1* trouvé chez *G. pallida* et déclenche une résistance par hypersensibilité en présence du gène de résistance *Gpa2* (Sacco et al. 2009).

#### **1.1.5. La lutte génétique contre les nématodes à kyste chez la pomme de terre**

Aujourd'hui, l'utilisation de produits chimiques est la méthode plus répandue pour lutter contre les nématodes. Néanmoins, la lutte chimique contre les nématodes est difficile, en raison de l'efficacité limitée des nématicides et de leur toxicité pour les autres organismes du sol. De plus, les nématodes passent la majeure partie de leur vie à l'intérieur des racines des plantes ou dans le kyste, dans laquelle ils ne sont pas accessibles et largement insensibles aux pesticides (Caromel and Gebhardt 2011).

Des pratiques culturales comme la rotation des cultures et l'application d'amendements organiques ont été testées pour réduire les populations de nématodes (Nicol et al. 2011). Cependant, les juvéniles, protégés à l'intérieur de l'enveloppe du kyste peuvent persister pendant de nombreuses années dans le sol en l'absence d'une plante hôte, ce qui fait que la rotation des cultures est peu efficace. Des méthodes biologiques tels que la solarisation, les biofumigants et les cultures pièges ont été testés pour réduire les populations de nématodes, mais ne semblent pas être applicables en conditions de culture à l'heure actuelle (Mekete et al. 2009, Radivojevic 2009, Deliopoulos et al. 2008, Grubisic et al. 2008). Par conséquent, le contrôle des nématodes seulement par l'application des pesticides et des pratiques culturales est difficile.

Actuellement, les méthodes de lutte les plus prometteuses reposent sur l'utilisation de variétés de plantes suffisamment résistantes pour assurer un contrôle durable des populations de nématodes. L'utilisation de gènes de résistance aux nématodes est un moyen efficace et une méthode respectueuse de l'environnement pour la gestion de ces parasites. De nombreuses sources de résistance ont été signalées et examinées pour les nématodes à galles et les nématodes à kyste. Les résistances naturelles aux nématodes sont introduites par sélection classique dans les plantes cultivées à partir d'espèces sauvages ou cultivées apparentées à la pomme de terre (Finkers-Tomczak 2011).

#### **1.1.5.1. Les sources de résistance à *Globodera pallida* chez la pomme de terre**

Aucune résistance aux nématodes n'a été trouvée au sein de l'espèce *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. En revanche, de nombreuses espèces apparentées sont résistantes aux nématodes à kyste. Des facteurs génétiques de résistance aux nématodes à kyste provenant des espèces *S. tuberosum* ssp. *andigena* et *S. vernei* ont été incorporés depuis plusieurs décennies dans les programmes de sélection (Ross 1986, Rousselle-Bourgeois et Mugniery 1995) et sont actuellement présents dans des variétés commerciales. C'est le cas en particulier du gène majeur de résistance *HI*, originaire de *S. tuberosum* ssp. *andigena* (Ellenby 1954), qui confère la résistance aux pathotypes *Ro1* et *Ro4* de *G. rostochiensis*. Cependant, la grande diffusion de variétés résistantes à *G. rostochiensis* a favorisé la multiplication des pathotypes de *G. pallida*, contre lesquels *HI* n'est pas efficace. La résistance conférée par le gène *HI*, ne couvre pas tous les pathotypes de *G. rostochiensis* et la résistance à *G. pallida* originaire de *Solanum vernei* est polygénique. Il est donc difficile d'introduire dans une variété cette résistance polygénique. Les espèces les plus fréquemment citées comme sources de résistance

sont *Solanum tuberosum* ssp *andigena*, *Solanum vernei*, *S. gourlayi*, *S. spegazzinii* pour *G. rostochiensis* et *Solanum vernei*, *S. gourlayi*, *S. spegazzinii*, *S. sparsipilum* pour *G. pallida* (Dellaert et Hoekstra 1987, Rousselle-Bourgeois et Mugniery 1995, Turner 1989, Mugniery 2001).

#### **1.1.5.2. Cartographie de gènes et de QTL de résistance**

Au cours des 20 dernières années, les recherches sur la résistance aux nématodes sur des bases génétiques et moléculaires ont ouvert deux nouvelles options, qui peuvent faciliter la sélection. Tout d'abord, la dissection génétique de la résistance aux nématodes basée sur les cartes génétiques a permis l'identification de marqueurs d'ADN, qui sont étroitement liés à des locus de résistance d'origines diverses. Ces marqueurs peuvent aider à l'introgession de gènes de résistance spécifiques en réduisant le nombre de tests phénotypiques et en augmentant la précision de la sélection. De plus, un petit nombre de gènes conférant une résistance aux nématodes ont été clonés et caractérisés au niveau moléculaire. Ces gènes peuvent être transférés et adaptés dans les cultivars sensibles par transformation génétique, évitant ainsi les longs cycles de reproduction nécessaires pour introgresser gènes de résistance venant d'espèces sauvages.

Depuis le développement de marqueurs moléculaires, de nombreux gènes majeurs et des QTL impliqués dans la résistance aux nématodes ont été localisés sur des cartes génétiques des espèces cultivées. Le soja, les céréales, les espèces du genre *Prunus* et la famille des Solanacées (pomme de terre, tomate, piment, etc.) ont été les plus étudiés en ce qui concerne la génétique de la résistance aux nématodes (Caromel and Gebhardt 2011).

##### **a) Des gènes et des QTL de résistance à *G. rostochiensis***

Plusieurs gènes majeurs conférant une résistance complète à *G. rostochiensis* ont été décrits, alors que la résistance à *G. pallida* est essentiellement quantitative en raison de son déterminisme oligogénique. *Gro1* a été le premier gène de résistance au nématode *G. rostochiensis* cartographié chez la pomme de terre. Le locus *Gro1*, cartographié sur le chromosome VII, provient de l'espèce sauvage apparentée à la pomme de terre *S. spegazzinii* (Barone et al. 1990). Par la suite, le gène *HI* provenant de *S. tuberosum* ssp. *andigena* a été cartographié sur le chromosome V (Gebhardt et al. 1993, Pineda et al. 1993) ainsi que le gène *GroVI* provenant de *S. vernei* dans une position similaire sur le bras court du même chromosome (Jacobs et al. 1996). Etant donné que ces gènes majeurs se sont révélés efficaces

et n'ont pas été facilement contourné par les populations *G. rostochiensis*, une seule étude a été faite sur la dissection génétique de la résistance quantitative (Kreike et al. 1993). De ce fait, la résistance quantitative n'a pas été utilisée dans programmes de sélection. En 2000, la moitié de la superficie emblavée en pommes de terre en Grande-Bretagne a été planté avec des cultivars résistants à *G. rostochiensis* (Trudgill et al. 2003), la plupart d'entre eux portant le gène *H1*. Le gène *H1* est l'une des rares réussites dans l'introgession d'une résistance génétique durable contre un agent pathogène chez la pomme de terre cultivée. Toutefois, l'usage répété de cultivars contenant *H1* a conduit à la sélection de *G. pallida* dans de nombreuses régions du Royaume-Uni.

### **b) Des gènes et des QTL de résistance à *G. pallida***

La sélection pour la résistance à *G. pallida* est beaucoup plus difficile que la sélection pour la résistance à *G. rostochiensis*. Le déterminisme génétique de la résistance, provenant de cinq espèces sauvages apparentées à la pomme de terre, *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. spegazzinii*, *S. vernei*, *S. sparsipilum* et *S. tarijense* a été étudiée. *Gpa2* provenant de *S. tuberosum* ssp. *andigena* est le seul gène majeur de résistance à *G. pallida* et il a été localisé sur le chromosome XII de la pomme de terre (Roupe van der Voort et al. 1999). Ce gène, qui confère la résistance à une gamme très restreinte de populations de *G. pallida*, a été introgressé dans *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* en raison de sa proximité immédiate avec le gène *Rx*, qui confère une résistance extrême au *Potato Virus X* (Roupe van der Voort et al. 1999). À cause de son spectre étroit, l'utilité du gène *Gpa2* dans les zones de culture de la pomme de terre est faible.

Chez la pomme de terre, les résistances à haut niveau et à large spectre face à *G. pallida* sont oligogéniques et déterminés généralement par un QTL à effet majeur et un ou plusieurs QTL à effet mineur. Des QTL à effet majeur ont été cartographiés chez plusieurs espèces. Le QTL *GpaIV<sup>S</sup><sub>adg</sub>* a été cartographié sur le bras court du chromosome IV chez *S. tuberosum* ssp. *andigena* (Bradshaw et al. 1998, Bryan et al. 2004, Moloney et al. 2010), le QTL *GpaXI<sup>I</sup><sub>tar</sub>* a été cartographié sur le bras long du chromosome XI chez *S. tarijense*, (Tan et al. 2009) et plusieurs QTL ont été cartographiés sur le chromosome V chez trois espèces : *Gpa* et *GpaM1* chez *S. spegazzinii* (Kreike et al. 1994, Caromel et al. 2003 respectivement), *Gpa5* et *Grp1* chez *S. vernei* (Bryan et al. 2002, Roupe van der Voort et al. 2000, Roupe van der Voort et al. 1998) et *GpaV<sub>spl</sub>* chez *S. sparsipilum* (Caromel et al. 2005). *Grp1* confère également une résistance à *G. rostochiensis*.

Des QTL à effet mineur agissant sur la résistance à *G. pallida* ont été cartographiés sur les chromosomes IV, VI, VIII et XII chez *S. spegazzinii* (Caromel et al. 2003, Kreike et al. 1994), sur le chromosome XI chez *S. sparsipilum* (Caromel et al. 2005) et chez *S. andigena* (Bryan et al. 2004) et sur le chromosome IX chez *S. vernei* (Bryan et al. 2002, Rouppe van der Voort et al. 2000) et/ou *S. tarijense* (Tan et al. 2009). Des interactions épistatiques entre les QTL à effet majeur et les QTL à effet mineur ont été détectés dans *S. tarijense* et *S. sparsipilum*. Chez *S. sparsipilum*, la présence conjointe des allèles de résistance aux deux QTL stimule une réaction de résistance qui prend la forme d'une nécrose forte autour du nématode (Caromel et al. 2005).

Des nombreuses nouvelles sources de résistances aux nématodes à kyste de la pomme de terre ont été découvertes récemment dans la Potato Commonwealth Collection (Castelli et al. 2003). Le déterminisme génétique de ces nouvelles sources n'a pas été publié à ce jour.

Les nématodes à kyste de la pomme de terre attaquent aussi la tomate. Le gène *Hero*, introgressé à partir de l'espèce sauvage *Solanum pimpinellifolium*, apparentée à la tomate, confère un haut niveau de résistance à tous les pathotypes de *G. rostrchensis* et une résistance partielle à *G. pallida*. Ce gène a été localisé sur le bras court du chromosome T4 de la tomate (Ganal et al. 1995). Cette zone génomique est colinéaire avec la région du chromosome IV de la pomme de terre, où le QTL *GpaVI<sup>S</sup><sub>adg</sub>* a été cartographiée (Bradshaw et al. 1998, Bryan et al. 2004, Moloney et al. 2010).

### c) Des gènes et des QTL de résistance aux nématodes à galles

Les espèces de nématodes à galles les plus fréquentes chez les Solanacées sont *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*, dans les climats méditerranés, tropicaux et équatoriaux, et *M. hapla*, *M. fallax* et *M. chitwoodi* dans les climats tempérés. La résistance aux nématodes à galles provient des espèces sauvages apparentées à la tomate, *S. arcanum* et *S. peruvianum* (anciennement appartenant au complexe *Lycopersicon peruvianum*) (Ammati et al. 1985, Veremis et al. 1999, Veremis et Roberts 1996a, b, c, 2000) et *S. tuberosum* et *S. sparsipilum* pour la pomme de terre (Brown et al. 1996, Kouassi et al. 2006). Chez le piment, la résistance provient de l'espèce cultivée *Capsicum annuum*, ainsi que des espèces apparentées (Djian-Caporalino et al. 2007). Six gènes *Me* proviennent de *Capsicum annuum* et ils sont regroupés dans une région de 28 cM sur le chromosome 9 du piment (Djian-Caporalino et al. 2007). Les trois gènes *Mi* (*Mi-1*, *Mi-9* et *Mi-3*) cartographiés chez la tomate



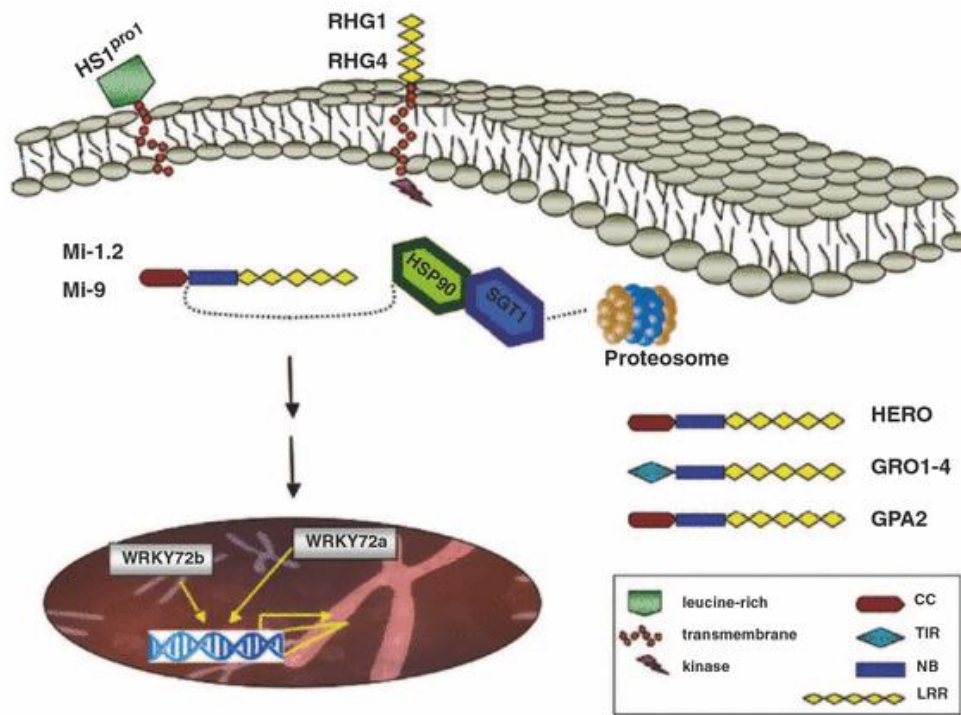
sont situés sur le chromosome 6 (Ammiraju et al. 2003, Klein-Lankhorst et al. 1991, Messeguer et al. 1991) et sur le chromosome 12 (Yaghoobi et al. 1995). Chez la pomme de terre, les gènes de résistance à *M. fallax*, *MfaXII<sup>sp</sup>*, (Kouassi et al. 2006) et à *M. chitwoodi*, *Rmc1* (Brown et al. 1996) sont situés sur les chromosomes XII et XI, respectivement. Fait intéressant, les régions génomiques de gènes de résistance aux nématodes qui ont été cartographiés sur le chromosome XII de la pomme de terre, le chromosome T12 de la tomate et le chromosome P9 du piment sont colinéaires (Djian-Caporalino et al. 2007). Ainsi, la majorité des gènes conférant une résistance aux nématodes à galles dans les cultures de Solanacées pourrait descendre d'un ancêtre commun.

Tous les cultivars de tomate résistants aux nématodes à galles (*M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*) actuellement disponibles possèdent le gène *Mi-1* de *S. peruvianum*. Cependant, la résistance conférée par *Mi-1* est inefficace au-delà de 28°C (Williamson et al. 1998). Le gène *Mi-9* de *S. arcanum*, situé dans la même région génomique que *Mi-1*, a le même spectre d'action que *Mi-1* mais est insensible à la température. L'utilisation répétée de *Mi-1* dans l'amélioration de la tomate a sélectionné des populations *Meloidogyne sp*, qui sont capables de se développer sur les plantes porteuses de ce gène de résistance (Castagnone-Sereno et al. 2001, Jacquet et al. 2005, Kaloshian et al. 1996, Tzortzakakis et al. 2005). D'autres gènes de résistance *Mi* sont difficiles à introgresser dans des cultivars à cause de la barrière sexuelle entre les espèces sauvages et cultivées. Parmi les autres gènes *Mi*, *Mi-3* est particulièrement intéressant car il est efficace à hautes températures, et contre les souches de *M. incognita* virulentes sur *Mi-1* (Yaghoobi et al. 1995).

### 1.1.5.3. Les résistances artificielles

Les ARN interférents (ARNi) suppriment l'expression d'un gène à l'aide des molécules de séquences spécifiques, homologues à l'ARN. Chez *Caenorhabditis elegans* ce phénomène a été rapporté par Guo et Kemphues (1995) et démontré par Fire et al. (1998). La présence d'ARN double brin (ARNdb) est responsable de la production de l'activité d'interférence. Ce phénomène d'extinction de l'expression se produit dans plusieurs organismes eucaryotes, y compris chez les nématodes et les plantes supérieures (Hammond et al. 2001).

Chez *C. elegans*, l'extinction du gène par l'ARNi a été utilisé de façon transitoire pour éteindre l'expression de la quasi-totalité des gènes (Fraser et al. 2000, Maeda et al. 2001, Kamath et al. 2003). L'extinction du gène peut être accomplie chez *C. elegans* par l'ingestion



**Figure 1.4 :** Structures et localisation de quelques gènes de résistance aux nématodes caractérisés au niveau moléculaire. CC : domaine Coiled-coil ; TIR : domaine Toll-interleukin receptor-like ; NB : domaine Nucleotide-binding ; LRR: domaine Leucine-rich repeat (D'après Kaloshian et al. 2011).

de bactéries exprimant des ARN double brin (Timmons et al. 1998), par l'absorption par voie orale d'ARN double brin en solution (Tabara et al. 1998) ou par micro-injection (Mello et Conte 2004). De ces trois méthodes, les deux dernières sont les stratégies les plus largement explorées.

L'extinction de gènes par ARNi a été utilisée chez le soja pour cibler des gènes essentiels chez *H. glycines* entraînant une réduction du nombre de femelles se développant sur les racines de plantes transgéniques (Klink et al. 2009). Les ARN double brin, produits par les plantes transgéniques, sont ingérés par les nématodes via leur stylet et induisent l'extinction de l'expression du gène cible du nématode. Ce succès chez le soja augmente la probabilité que l'approche ARNi ait un impact agricole (Dalzell et al. 2009). Malgré les rapports passionnants décrits ci-dessus, les résultats des expériences d'ARNi doivent être pris avec prudence, dus au problème pratique d'utilisation des « OGM », interdits par la réglementation européenne.

### 1.1.6 Les gènes de résistance aux nématodes clonés

Au début de l'année 2013, dix gènes conférant une résistance aux nématodes ont été caractérisés au niveau moléculaire. La figure 1.4 montre les structures et la localisation de quelques gènes de résistance clonés. Le premier gène de résistance cloné a été *Hs1<sup>pro-1</sup>*, isolé chez la betterave à sucre et qui agit contre le nématode à kyste *H. schachtii* (Cai et al. 1997). *Hs1<sup>pro-1</sup>* a été cloné par une approche de clonage positionnel. La protéine codée par *Hs1<sup>pro-1</sup>* contient une région N-terminale portant un domaine extracellulaire LRR et un domaine transmembranaire. Il n'a pas de similitudes évidentes avec d'autres gènes de résistance. *Hs1<sup>pro-1</sup>* est spécifiquement exprimé dans le syncytium de *H. schachtii* et il est induit suite à la formation du site nourricier des nématodes (Thureau et al. 2003).

La caractérisation moléculaire de *Hs1<sup>pro-1</sup>* a été suivie par le clonage de plusieurs gènes de résistance chez la famille des Solanacées: *Mi-1.2* a été isolé chez la tomate (Milligan et al. 1998, Vos et al. 1998) ; son homologue *CaMi* a été isolé chez le piment (Chen et al. 2007) ; *Gpa2* a été isolé chez la pomme de terre (van der Vossen et al. 2000) ; *Hero* a été isolé chez la tomate (Ernst et al. 2002) ; *Gro1-4* a été isolé chez la pomme de terre (Paal et al. 2004), *Ma* a été isolé chez *Prunus cerasifera* (Claverie et al. 2011), *Rhg1* et *Rhg4* ont été isolés chez le soja (Cook et al. 2012 et Liu et al. 2012 respectivement) et *Cf-2* a été isolé chez la tomate

(Lozano-Torres et al. 2012). *Mi-1.2*, *CaMi*, *Hero*, *Gro1-4* et *Ma* appartiennent à la classe de gènes de résistance NBS-LRR.

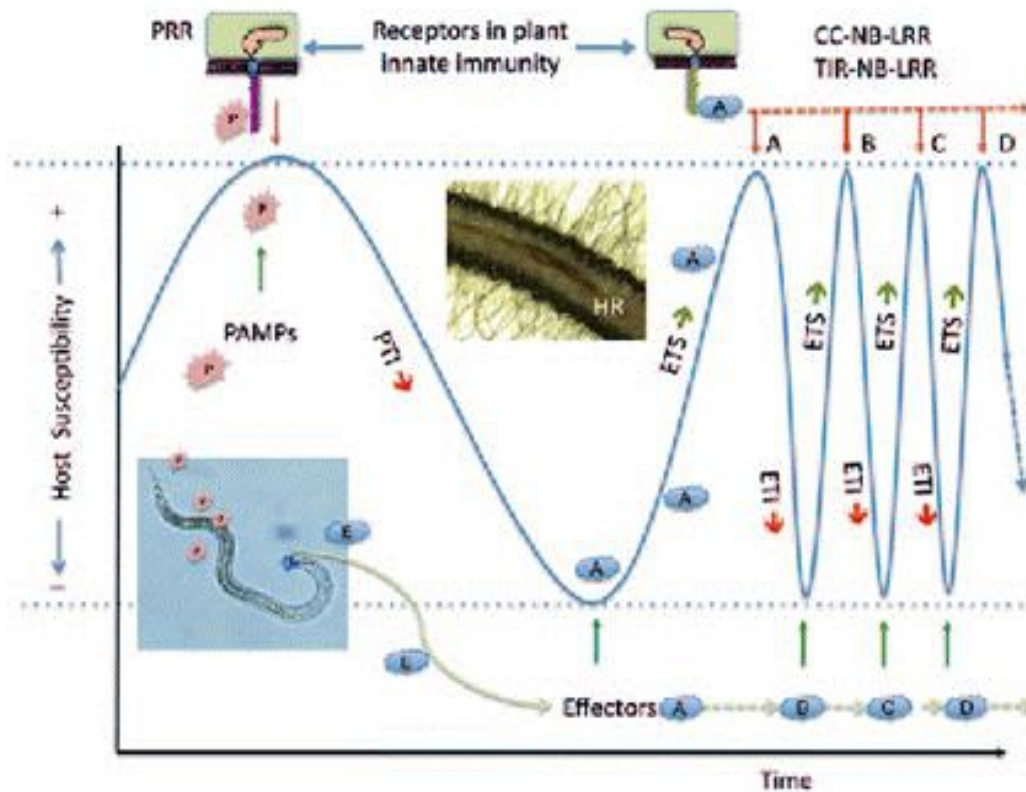
Le gène *Mi-1.2* a été cloné simultanément par deux équipes chez la tomate par une approche de clonage positionnel (Milligan et al. 1998, Vos et al. 1998). Il appartient à la classe CC-NBS-LRR et confère une résistance à plusieurs espèces de *Meloidogyne*, mais aussi au puceron de la pomme de terre *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi et al. 1998), le psylle de la tomate *Bactericerca cockerelli* (Casteel et al. 2006) et l'aleurode *Bemisia tabaci* (Nombela et al. 2003). *Mi-1.2* est un membre d'un groupe de sept homologues, répartis sur une région génomique de 650 kb du génome (Seah et al. 2004).

*CaMi*, un homologue de *Mi-1.2* a été cloné à partir d'une accession de piment résistant, par une approche gène candidat (Chen et al. 2007). Cet homologue partage une 99 % d'identité avec *Mi-1.2* au niveau des acides aminés.

Le gène *Gpa2*, originaire de *S. tuberosum* ssp. *andigena*, appartient aussi à la classe CC-NBS-LRR de gènes de résistance. L'efficacité de *Gpa2* est restreinte à quelques populations de nématodes à kyste de *G pallida*. *Gpa2* est étroitement lié au gène de résistance *Rx* chez la pomme de terre, qui confère la résistance au PVX (van der Vossen et al. 2000). Huit *Gpa2/Rx* homologues sont présents dans un intervalle de moins de 200 kb sur le chromosome XII dans le parent diploïde résistant à partir duquel a été cloné *Gpa2* (Bakker et al. 2003).

Le gène *Hero*, caractérisé chez la tomate, confère une résistance aux deux espèces de nématodes à kyste de la pomme de terre *G. rostochiensis* et *G. pallida*. Il code pour une protéine CC-NBS-LRR. *Hero* est un membre d'un cluster de 14 paralogues distribués dans une région de 118 kb (Ernst et al. 2002). Il est constitutivement exprimé dans tous les tissus végétaux, mais son niveau d'expression augmente dans des racines infectées par les nématodes à kystes (Sobczak 2005).

Le gène *Gro1-4*, provenant de *S. spegazzinii*, a été cloné par une approche gène candidat. Il appartient à la deuxième sous-famille NBS-LRR, portant un domaine TIR à son extrémité N-terminale et il fait partie d'une famille de neuf gènes homologues. Huit de ces homologues, y compris le fonctionnel *Gro1-4* sont répartis sur une région d'environ 450 kb sur le chromosome VII (Paal et al. 2004). *Gro1-4* est exprimée de façon constitutive dans les



**Figure 1.5 :** Le système immunitaire des plantes. Modèle en zig-zag appliqué aux interactions plantes-nématodes. PTI : 'immunité déclenchée par des PAMP ; ETI : Immunité déclenchée par des effecteurs ; PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ; ETS : Sensibilité déclenchée par des effecteurs ; HR : Résistance par hypersensibilité (D'après Jones et Dangl, 2006).

racines non infectées et la source végétale du gène *Gro1-4* présente une résistance à large spectre à tous les pathotypes connus de *G. rostochiensis*.

Le gène *Ma* a été cloné chez *Prunus cerasifera* par une approche de clonage positionnel. Il appartient à la famille de gènes de résistance TIR-NBS-LRR et confère une résistance complète à plusieurs espèces de *Meloydogyne* (Claverie et al. 2011). De plus, par comparaison avec le gène *Mi-1* de la tomate, cette résistance est stable à hautes températures.

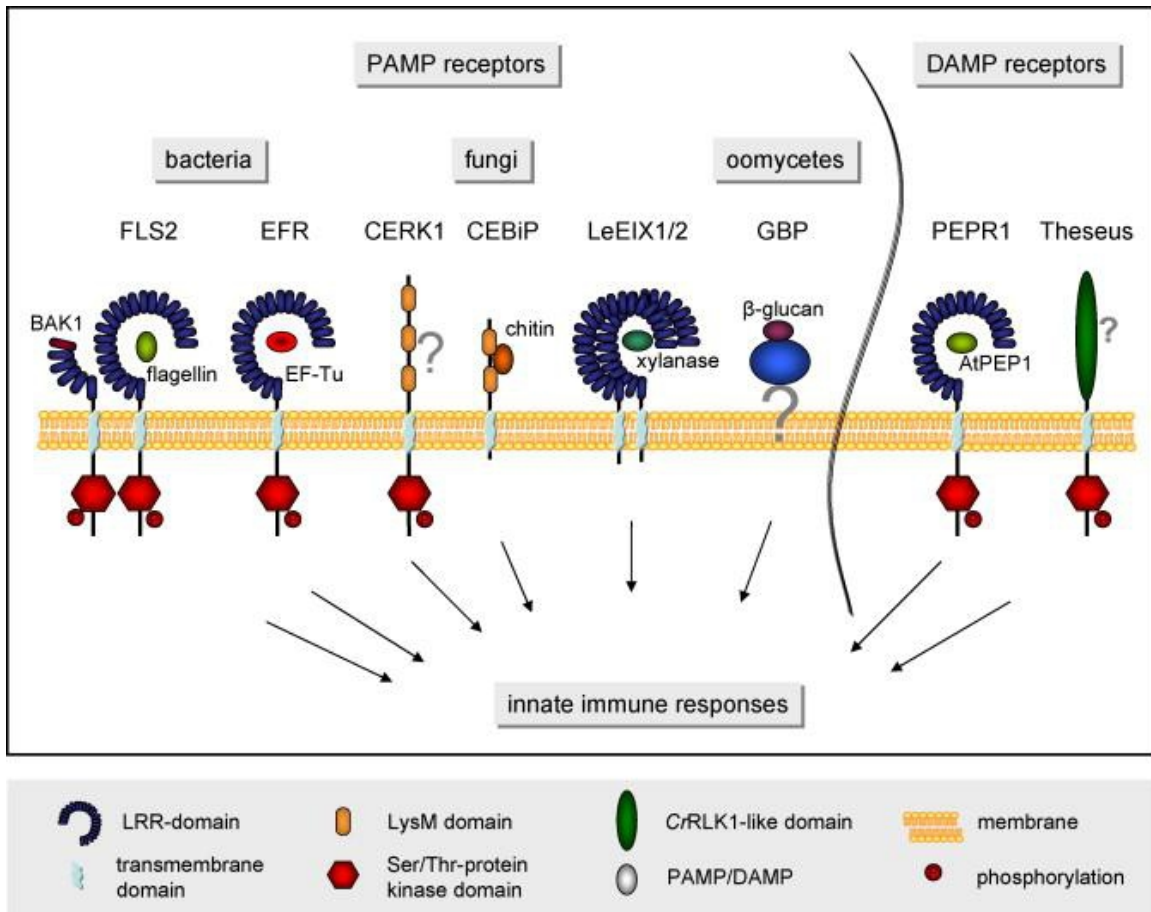
Le gène *Rhg4* a été cloné chez le soja par une approche de clonage positionnel et il confère la résistance à *H. glycines* (Liu et al. 2012). Ce gène montre un nouveau mécanisme de résistance des plantes face aux pathogènes. Le gène code pour une sérine-hydroxyméthyltransférase, une enzyme de structure conservée entre règnes et qui est omniprésent dans la nature.

Le gène *Rhg1* a été caractérisé chez le soja par une approche de clonage positionnelle. Il confère la résistance à *H. glycines* (Cook et al. 2012). La résistance médiée par le locus *Rhg1* est conférée par une variation du nombre de copies d'un cluster de trois gènes appartenant à des familles différentes : un transporteur d'acides aminés, une protéine  $\alpha$ -SNAP et une protéine WI12 (Wound-inducible domain). Alors que l'allèle de sensibilité possède une copie d'un segment de 31 kb sur lequel ces 3 gènes sont répartis, l'allèle de résistance en possède 10 copies, ce qu'augmente le niveau d'expression de chacun des trois gènes.

Le gène *Cf-2* a été cloné chez la tomate. Il code pour un récepteur de reconnaissance des patterns (PRR) extracellulaire et il confère la résistance au nématode *G. rostochiensis* et au champignon *Cladosporium fulvum* (Lozano-Torres et al. 2012).

## **1.2. Le système immunitaire des plantes**

Les plantes ont développé des mécanismes de défenses multiples pour se protéger contre les attaques d'un grand nombre de microbes et de parasites. La plupart des agresseurs potentiels ne sont pas en mesure de contourner les barrières physiques et chimiques constitutives d'une plante. Mais ceux qui passent ces premières lignes de défense passive rencontrent un système immunitaire inné, actif et agissant à plusieurs niveaux (Jones et Dangl, 2006). La figure 1.5 décrit le système immunitaire des plantes. Le premier niveau de résistance est basé sur la reconnaissance des motifs moléculaires hautement conservés associés aux pathogènes (PAMP pour Pathogen-associated molecular pattern), lesquels sont



**Figure 1.6 :** Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) connus chez les plantes. Des motifs moléculaires hautement conservés associés aux pathogènes (PAMP) provenant de différents agents pathogènes sont perçus par des récepteurs de motifs moléculaires associés aux pathogènes (Postel et Kemmerling 2009).

reconnus par des récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR pour Pattern Recognition Receptors). La reconnaissance des PAMP par les récepteurs immunitaires des plantes peut conduire à l'activation de mécanismes de résistance non spécifiques appelés l'immunité déclenchée par des PAMP (PTI pour PAMP-triggered immunity). Certains agents pathogènes de plantes utilisent des effecteurs spécifiques pour supprimer la PTI (Boller et Felix, 2009). Cependant, les plantes ont développé des gènes de résistance (gènes R) codant des récepteurs immunitaires qui reconnaissent ces effecteurs d'une manière très spécifique. La reconnaissance spécifique des effecteurs par les récepteurs immunitaires active « l'immunité déclenchée par des effecteurs » (ETI pour Effector-triggered immunity) (Jones et Dangl, 2006).

### **1.2.1. L'immunité déclenchée par des PAMP (PTI)**

L'immunité déclenchée par des PAMP (PTI) constitue un premier niveau de défense très ancien, basé sur la perception des structures microbiennes conservées. Il est basé sur la reconnaissance de PAMP par les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR). La figure 1.6 montre les récepteurs de reconnaissance des motifs (PRR) connus chez les plantes. La PTI est efficace contre un large spectre de micro-organismes envahisseurs. Il existe des similitudes frappantes entre les systèmes immunitaires innés des plantes et des animaux, qui pointent un mécanisme commun optimisé qui a évolué indépendamment dans les deux règnes. Les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR) des deux règnes sont constitués de complexes de récepteurs riches en répétitions de leucines (LRR pour Leucine-rich repeat), qui permettent la détection de l'invasion des pathogènes à la surface cellulaire. Chez les plantes, des PRR comme FLS2 et EFR sont contrôlés par un co-récepteur SERK3/BAK1, riche en répétitions de leucines qui se dimérise avec les PRR pour appuyer leur fonction (Postel et Kemmerling 2009).

Bien qu'il n'existe pas à ce jour de PAMP identifiés provenant des nématodes, l'analyse globale de l'expression génique et des symptômes associés à l'infection par les nématodes, tels que la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS), l'épaississement de la paroi cellulaire et les dépôts de callose, soutient l'hypothèse de la présence des PAMP chez les nématodes et suggère que dans les sécrétions de nématodes, certains effecteurs pourraient potentiellement agir comme PAMP (Hewezi et Baum 2012).



Mais pour surmonter ce premier niveau de défense, les agents pathogènes peuvent injecter des effecteurs dans les cellules végétales pour supprimer les réponses immunitaires initiées après la perception des PAMP, via l'inhibition ou dégradation des récepteurs (Postel et Kemmerling 2009).

## **1.2.2 L'immunité déclenchée par des effecteurs (ETI)**

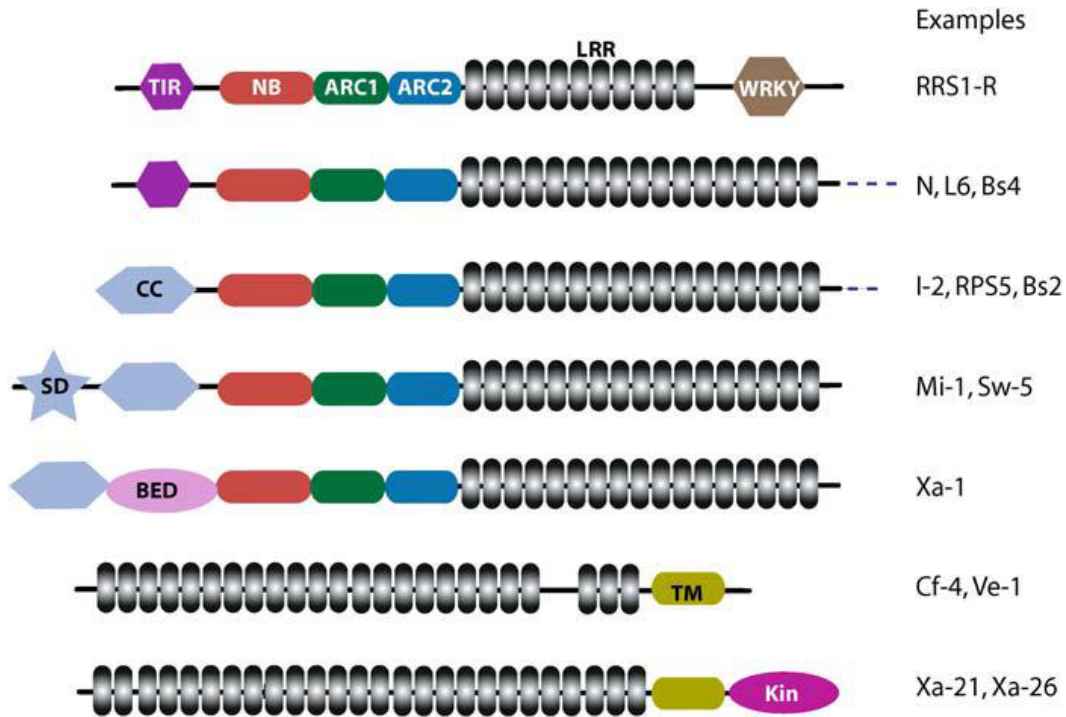
### **1.2.2.1. Le modèle « gène pour gène » de Flor**

La résistance « gène-pour-gène » chez les plantes est définie par l'interaction directe ou indirecte entre le produit d'un gène de résistance (R) et le produit du gène d'avirulence (Avr) correspondant. La résistance ne s'exprime que lorsque les deux gènes sont en présence : le gène R chez la plante et le gène Avr chez l'agent pathogène. La relation est alors qualifiée d'incompatible. Dans tous les autres cas, la maladie se développe, la relation est alors dite compatible (Flor, 1971). En l'absence de reconnaissance par la protéine R de l'hôte, les protéines Avr jouent un rôle dans la virulence du pathogène, souvent en détournant les mécanismes de défense (Chisholm et al. 2006, Takken et al. 2006).

### **1.2.2.2. ETI**

Les agents pathogènes peuvent surmonter les premiers niveaux de défenses basales par la sécrétion d'effecteurs spécifiques. La reconnaissance ultérieure de ces effecteurs par des récepteurs spécialisés (appelés protéines de résistance) déclenche l'induction d'un deuxième niveau de réactions de défense chez les plantes, appelée immunité déclenchée par des effecteurs (ETI) (Tameling et Takken, 2008). Ce type de défense est médiée par une protéine de résistance (R). D'une manière générale, les réactions associées à l'ETI sont plus rapides et plus fortes ; elles sont souvent accompagnées par une mort cellulaire localisée autour du site de l'infection (Jones et Dangl 2006).

En ce qui concerne les nématodes sédentaires, il semblerait qu'une pression de sélection constante leur ait permis acquérir la capacité de supprimer l'ETI, soit par la modification de leurs effecteurs qui ne sont alors plus reconnus par la plante, soit par l'acquisition de nouveaux effecteurs (Hewezi et Baum 2012). Par exemple, la protéine effectrice RBP-1 du nématode à kyste de la pomme de terre *G. pallida* provoque des réponses de défense, y compris une réaction d'hypersensibilité (HR) en présence des plantes possédant l'allèle de résistance du gène majeur *Gpa2* (Sacco et al. 2009).



**Figure 1.7 :** Représentation schématique des domaines trouvés dans les protéines de résistance comportant un domaine LRR, chez les plantes. TIR : domaine homologue aux gènes Toll/interleukin-1 receptor ; CC : Coiled coil ; NB : nucleotide binding ; ARC1 et ARC2 : domaine homologue aux gènes APAF1 chez l'homme, aux gènes R chez les plantes et au gène CED4 chez *C. elegans* ; LRR : Leucine rich repeat ; SD : solanaceous domain ; BED : BEAF/DREAF zinc finger domain ; TM : Transmembrane ; Kin : kinase ; WRKY : WRKY transcription Factor (Tameling et Takken 2008)

### 1.2.3. Structure des différents gènes de résistance

Une caractéristique commune des récepteurs impliqués dans la perception des pathogènes est un domaine riche en répétitions de leucines (LRR). Ce domaine est présent dans les récepteurs des PAMP (récepteurs RLK et RLP) et dans la plupart des protéines de résistance intracellulaires (Nürnberger et Kemmerling 2006). Une représentation des différentes catégories de gènes de résistance est illustrée sur la figure 1.7.

#### 1.2.3.1. Les protéines RLP et RLK

La classe des protéines de résistance extracellulaire RLP (pour receptor-like protein) a été principalement trouvée chez les solanacées. Les protéines de type Cf, impliquées dans la résistance à *Cladosporium fulvum* ont permis de fonder cette classe. Ces protéines sont composées essentiellement d'un domaine LRR extracellulaire ancrée dans la membrane plasmique (Rivas et Thomas 2005). Aucun domaine de signalisation intracellulaire n'a été détecté chez les protéines RLP. Il a été montré récemment que le gène *Cf-2*, appartenant à cette famille, conférait également la résistance au nématode à kyste de la pomme de terre, *G. rostochiensis* (Lozano-Torres et al. 2012).

La classe des protéines de résistance RLK (pour receptor-like kinase) possède un domaine LRR extracellulaire fusionné à un domaine transmembranaire et un domaine kinase de localisation cytoplasmique. Un exemple typique de gène RLK est Xa-21 qui confère la résistance à *Xanthomonas oryzae pv.oryzae* chez le riz. Récemment, un nouveau type de protéine de résistance RLK a été identifiée chez le riz : Pi-d2, qui confère la résistance à la pyriculariose. Dans cette protéine, le domaine LRR est remplacé par un domaine lectine-B (IecRLK). Dans les protéines des classes RLP et RLK, le domaine extracellulaire participe à la détection de l'agent pathogène (Chen et al. 2006).

#### 1.2.3.2. Les protéines NBS-LRR

La plupart de protéines de résistance actuellement identifiées comprennent un domaine LRR intracellulaire fusionné à un domaine de liaison à un nucléotide (nucleotide-binding ou NB). Les gènes NBS-LRR sont subdivisés en deux grandes sous-familles : TIR-NBS-LRR et CC-NBS-LRR, qui se distinguent par la présence ou l'absence d'un domaine TIR (Toll/interleukin-1) ou d'un domaine CC (Coiled coil) en position amino-terminale du récepteur (Meyers et al. 1999, Albrecht et Takken 2006, McHale et al. 2006, Takken et al.

2006). La figure 1.7 donne un aperçu des divers motifs des domaines structurels trouvés dans les différentes sous-familles de protéines de résistance NBS-LRR.

#### **a) Les domaines TIR/CC**

Le domaine TIR a été appelé ainsi à cause de son homologie avec les domaines Toll de la drosophile et le récepteur de l'Interleukine 1 de l'homme. Un motif CC (Coiled coil) est fréquent, mais pas toujours présent dans les 175 acides aminés en position amino-terminale du domaine NBS des gènes CC-NBS-LRR. Récemment, les structures cristallines des domaines CC et TIR ont été résolues. La détermination de la structure du domaine CC provient de Mla10, une protéine de résistance NBS-LRR de l'orge (Maekawa et al. 2011). La détermination de la structure du domaine TIR provient de la protéine L6 (NBS-LRR) du lin, conférant l'immunité à la rouille (Bernoux et al. 2011, Ve et al. 2011). Des observations récentes indiquent que la région amino-terminale d'au moins certaines protéines NBS-LRR se lie aux protéines de l'hôte (gardiennes) qui sont l'objet d'attaque des effecteurs des agents pathogènes, afin de surveiller leurs perturbations et de déclencher une réaction de résistance en cas d'interaction entre la protéine gardée et l'effecteur (Takken et Goverse 2012).

#### **b) Le domaine NB-ARC**

Le domaine NBS ou NB-ARC se compose de trois sous-unités, le sous-domaine de liaison à un nucléotide (NB), et les sous-domaines ARC1 et ARC2 (Takken et al. 2006, Takken et Goverse 2012). Il est appelé NB-ARC en raison de son homologie avec le gène Apaf-1 (apoptose protéase activant le facteur-1) de l'homme, les protéines R et les protéines CED-4 de *Caenorhabditis elegans* (van der Biesen et Jones 1998). Des études ont montré que le domaine NB-ARC peut se lier à des nucléotides et les hydrolyser, agissant ainsi comme un interrupteur moléculaire pour réguler l'activité des protéines de résistance dans la perception du pathogène (Lukasik et Takken 2009, Bernoux et al. 2011). Le domaine NB-ARC a une activité ATPase. L'hydrolyse du nucléotide entraîne un changement de conformation de la protéine. En effet, la structure cristalline du domaine NB-ARC de la protéine APAF-1 montre que la forme liée à l'ADP est dans une conformation fermée qui bloque Apaf-1 dans un état inactif (Shirazu 2009).

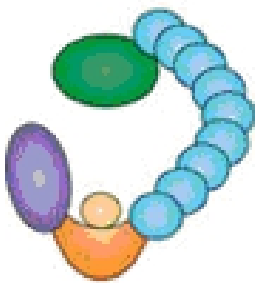
### **c) Le domaine LRR**

Le domaine LRR est un domaine riche en répétition de leucines. Les propriétés structurales du domaine LRR ont été déduites à partir d'un inhibiteur de la ribonucléase du porc (Kobe et Deisenhofer 1993). Les LRR des protéines NBS-LRR sont très irrégulières, avec différentes longueurs de répétition et des motifs LRR non-canoniques, ce qui entrave la construction de modèles structurels précis basée sur un modèle unique. Les différences dans le nombre de répétitions, dans les domaines LRR de protéines NBS-LRR, suggèrent l'existence de différentes classes structurales entre protéines NBS-LRR chez les plantes. Le motif LRR est un domaine de reconnaissance de patron moléculaire qui confère une spécificité de liaison. En raison de sa spécificité de liaison, le domaine LRR a été proposé comme un domaine récepteur pour des molécules dérivées de l'agent pathogène. Des expériences d'échange de domaines ont montré que le domaine LRR est essentiel pour déterminer la spécificité des processus de reconnaissance des gènes R-Avr (Ellis et al. 1999). Ces observations ont conduit à l'élaboration de modèles expliquant le fonctionnement des protéines de résistance, qui suggèrent que le domaine LRR est principalement responsable de la reconnaissance (directe ou indirecte) du produit Avr, ce qui conduit à des changements de conformation dans la protéine de résistance impliquant des interactions entre les différents domaines de cette protéine permettant la propagation du signal (Padmanabhan et al. 2009).

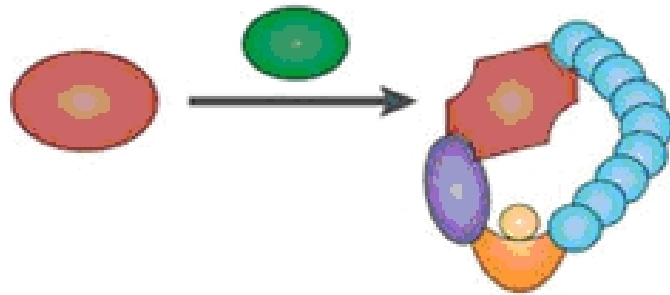
#### **1.2.4. Origine des gènes NBS-LRR**

Les gènes NBS-LRR diffèrent considérablement dans leur distribution phylétique et leurs voies de signalisation en aval (Aarts et al. 1998, Tarr et Alexander 2009). Ils sont souvent polymorphes entre individus d'une même population et l'ensemble complet de ces gènes définit le répertoire disponible pour la détection des effecteurs des pathogènes (Bakker et al. 2006, Zhang et al. 2009, Maekawa et al. 2011). Aujourd'hui, l'avalanche de données de génomes complets d'espèces diverses nous offre une occasion sans précédent pour explorer cette série de questions par une analyse comparative au niveau génomique. Yue et al. (2012) ont réalisé une vaste étude à l'échelle du génome de 38 organismes modèles représentatifs, couvrant tous les grands règnes d'organismes (eubactéries, archéobactéries, protistes, champignons, plantes et animaux) et identifiant tous les gènes homologues de gènes NBS-LRR, LRR-RLK, TLR (pour mammalian Toll-like membrane receptors) et NLR (pour Nod-like receptors) dans ces génomes. Ces données éclairent sur l'origine et l'histoire des gènes

**a Direct**



**b Guard/decoy**



**Figure 1.8 :** Les récepteurs NBS-LRR peuvent reconnaître des effecteurs de pathogènes soit par des mécanismes d'interactions directes, soit par des mécanismes d'interactions indirectes.

**a** En reconnaissance directe, l'effecteur (vert) déclenche la signalisation immunitaire par liaison physique au récepteur. La protéine NBS-LRR consiste en un domaine carboxy-terminal LRR (bleu clair), un domaine central NBS (orange) et un domaine amino-terminal TIR ou CC (ovale violet).

**b** Dans le modèle de garde et le modèle de leurre (decoy), l'effecteur modifie une protéine accessoire (rouge), qui peut être la cible du facteur virulence (modèle de garde) ou une protéine mimant la structure d'une telle cible (modèle de leurre) (D'après Dodds et Rathjen 2010).

NBS-LRR et leur relation évolutive avec, d'une part, les gènes LRR-RLK dans les plantes et d'autre part avec des gènes des TLR et NLR chez les animaux.

Ces données montrent aussi que les deux domaines principaux, NBS et LRR, existaient avant la séparation des procaryotes et des eucaryotes toutefois la fusion de ces deux domaines n'a été observée que chez les plantes terrestres. Les gènes de la classe TIR-NBS-LRR ont probablement eu une origine plus ancienne que leurs homologues non TIR. Les similitudes entre les systèmes immunitaires innés de plantes et d'animaux sont susceptibles d'avoir été façonnées par évolution convergente après leurs origines indépendantes (Yue et al. 2012).

### **1.2.5. Reconnaissance directe et indirecte d'une protéine Avr du pathogène**

La fonction principale des protéines NBS-LRR est la reconnaissance des effecteurs du pathogène pour déclencher l'ETI (Ellis et al. 2007). Les protéines NBS-LRR peuvent reconnaître les effecteurs, soit directement par association physique avec la protéine Avr (modèle récepteur-ligand), soit indirectement (modèle de garde ou modèle de leurre) (Van der Biesen et Jones, 1998; Dangl et Jones, 2001, van der Hoorn et Kamoun 2008). La figure 1.8 illustre les différents modes de reconnaissance des effecteurs.

#### **1.2.5.1. Reconnaissance directe : modèle récepteur-ligand**

Bien que de nombreuses paires de gènes de résistance et de gènes d'avirulence apparentés aient été identifiées, l'interaction directe n'a été prouvée que dans un faible nombre de cas (Jia et al. 2000, Deslandes et al. 2003, Dodds et al. 2006, Ueda et al. 2006). Dans le modèle récepteur-ligand, une reconnaissance directe se produit entre la protéine NBS-LRR de la plante et les protéines Avr des pathogènes. Ce modèle simple de reconnaissance a été démontré pour la première fois chez le riz pour la protéine Pi-ta. Pi-ta appartient à la famille de gènes de résistance CC-NBS-LRR et reconnaît l'effecteur Avr-Pita de *Magnaporthe grisea*. L'effecteur Avr-Pita se lie spécifiquement au domaine LRR de la protéine Pi-ta (Jia et al. 2000).

D'autres exemples reconnaissance directe sont les protéines L et M (TIR-NBS-LRR) chez le lin. Ces protéines confèrent la résistance aux souches du champignon *Melampsora lini*, qui sécrète les effecteurs AvrL567 et AvrM (Catanzariti et al. 2006, Dodds et al. 2004). Des interactions physiques directes, impliquant les complexes AvrL567/L et AvrM/M ont été

trouvées par l'intermédiaire de tests d'interaction en système double hybride chez la levure (Y2H) (Dodds et al. 2006).

### 1.2.5.2. Reconnaissance indirecte : le modèle de garde

Le modèle de garde prédit que les protéines de résistance R agissent en surveillant la cible d'un effecteur (gardiennage) et que la modification de cette cible par l'effecteur provoque l'activation de la protéine R, ce qui déclenche la réaction de résistance chez l'hôte (Van der Biesen et Jones, 1998; Dangl et Jones, 2001). Une notion implicite dans le modèle garde, est que la cible de la protéine effectrice (également appelé *gardee*) est indispensable pour la virulence du pathogène, en l'absence de la protéine de résistance apparenté.

Les exemples les mieux étudiés, en adéquation avec le modèle de garde, concernent les cibles *EDS1* et *RIN4* d'*Arabidopsis*, gardées respectivement par des gènes TIR-NBS-LRR et CC-NBS-LRR. Il a été démontré depuis plusieurs années que l'expression du gène *EDS1*, impliqué dans la résistance basale (PTI), était indispensable à la résistance conférée par plusieurs gènes de résistance de type TIR-NBS-LRR (Wiermer et al. 2005). Il a été démontré récemment que, chez *Arabidopsis*, *EDS1* était la cible des effecteurs bactériens AvrRps4 et HopA1 (Bhattacharjee et al. 2011). Les expériences menées par cette équipe et celles rapportées par Heidrich et al. (2011) indiquent qu'AvrRps4 et HopA1 perturbent un complexe formé par *EDS1* et les gènes *SNCI*, *RPS4* et *RPS6* (tous les trois de la famille TIR-NBS-LRR). La déstabilisation de ce complexe entraîne le déclenchement de la réaction de résistance.

La protéine *RIN4* d'*Arabidopsis* est gardée par deux gènes de résistance de type CC-NBS-LRR : *RPM1* et *RPS2*. Les effecteurs bactériens AvrRpm1 et AvrB, en phosphorylant *RIN4*, activent le déclenchement de la réaction de résistance due à *RPM1*. La résistance due à *RPS2* est déclenchée après le clivage de la protéine *RIN4* par l'effecteur bactérien AvrRpt2 (Axtell et al. 2003, Mackey et al. 2002, 2003). HopF2 est une ADP-ribosyltransférase, qui peut modifier *RIN4*, laquelle est nécessaire pour l'activité de virulence de la bactérie (Wilton et al. 2010).

Ainsi, une cible commune à plusieurs effecteurs non apparentés pourrait expliquer pourquoi un même gène NBS-LRR peut conférer la résistance à plusieurs pathogènes, comme c'est le cas pour le gène *Mi* de la tomate (Rossi et al. 1998, Casteel et al. 2006, Nombela et al. 2003).



### 1.2.5.3. Reconnaissance indirecte : le modèle de leurre (decoy)

Au cours des dernières années, de nouvelles données sur la reconnaissance indirecte des effecteurs sont apparues. Elles sont incompatibles avec la description originale du modèle garde. Par exemple, les cibles des effecteurs AvrPto and AvrBs3 indiquent que certaines cibles chez l'hôte agissent comme leurres (decoy) pour détecter les effecteurs des pathogènes via les protéines de résistance (Zhou et Chai 2008, Zipfel et Rathjen 2008). Le modèle de leurre se distingue du modèle de garde car il implique que la manipulation de la cible par l'effecteur n'augmente pas le pouvoir adaptatif (fitness) du pathogène en l'absence de la protéine de résistance (van der Hoorn et Kamoun 2008).

Le gène *Pto* de la tomate serait un exemple de reconnaissance indirecte, en adéquation avec le modèle de leurre. *Pto* code une serine-thréonine kinase. Il est la cible de deux effecteurs de *Pseudomonas syringae*, AvrPto et AvrPtoB (Thilmony et al. 1995). *Pto* se lie directement à la partie N-terminale d'un gène CC-NBS-LRR, *Prf*. Il a été montré récemment que des protéines *Prf* formaient un homodimère, et que chaque monomère était capable d'interagir avec la protéine *Pto* ou un membre de sa famille, avant la stimulation par AvrPto. De plus, l'accumulation de la protéine *Pto* dépend de l'accumulation de la protéine *Prf* (Mucyn et al. 2008). *Pto* semble donc faire partie d'un complexe préformé de résistance incluant la protéine *Prf*, où *Pto* serait la cible d'effecteurs bactériens et serait sous la surveillance de *Prf* (Oh et Martin 2011). Le couple *Pto-Prf* avait été décrit précédemment comme un exemple du modèle de garde (Dangl et Jones 2001). Cependant, *Pto* ne semble pas être une cible importante pour AvrPto, car l'absence d'expression de *Pto* ou de *Prf* ne permet pas à la bactérie de gagner en virulence. De plus, des souches bactériennes, mutées dans le gène *AvrPto* et ayant perdu l'interaction avec *Pto* restent virulentes (Pedley et Martin 2003). D'autres protéines kinases, induites par des PAMP, sont également la cible d'AvrPto et d'AvrPtoB. Ces observations vont dans un sens où *Pto* serait un leurre (decoy), mimant des protéines kinases impliquées dans des réactions de défense non spécifique (PTI), que les effecteurs AvrPto et AvrPtoB auraient pour fonction d'inhiber (Oh et Martin 2011, Zeng et al. 2012). L'interaction entre AvrPto ou d'AvrPtoB avec *Pto* déstabiliserait alors le complexe *Pto-Prf* pour conduire à une réaction de résistance spécifique (ETI).

### 1.2.6. Interactions intramoléculaires

L'activation de l'ETI est souvent accompagnée d'une réponse d'hypersensibilité (HR). Elle est coûteuse pour la plante et sa prolifération pourrait être fatale. Par conséquent, ce type

d'immunité doit être strictement régulé. Une façon de maintenir les protéines NBS-LRR sous contrôle est l'auto-inhibition, qui semble être obtenue par des interactions intramoléculaires entre les différents domaines. La délétion du domaine LRR de certaines protéines NBS-LRR entraîne un phénotype d'auto-activation de faible intensité, ce qui indique que le domaine LRR avait un rôle dans la régulation négative de l'activité des protéines NBS-LRR (Bendahmane et al. 2002, Weaver et al. 2006, Zhang et al. 2004). Toutefois, les domaines LRR peuvent aussi avoir un rôle régulateur positif, par exemple une protéine CNL contenant des mutations d'auto-activation dans son domaine NBS ne conduit pas à l'activation de l'ETI à moins que le domaine LRR ne soit co-exprimé (Moffett et al. 2002, Rairdan et Moffett 2007). Des mutants auto-actifs peuvent être obtenus par l'introduction de mutations ponctuelles spécifiques dans les protéines R et par des échanges de domaines (domain swapping) entre paralogues étroitement liés, comme cela a été montré pour les gènes *Mi-1.2*, *Rx*, *Rp1* et *L6* (Howles et al. 2005, Hwang et al. 2000, Rairdan et Moffett 2006, Sun et al. 2001).

Ces observations conjointes soutiennent un modèle dans lequel les protéines NBS-LRR seraient maintenues dans un état d'auto-inhibition par de nombreuses interactions entre les différents domaines. Une perturbation ou un défaut d'alignement de ces interactions libérerait l'auto-inhibition de la protéine et permettrait de passer à son état activé. Des preuves de ces interactions intramoléculaires sont fournies par l'association observée entre les domaines CC et NB-ARC-LRR de *Rx* et entre les domaines LRR et CC-NB-ARC de *B-2* et de *Rx* (Leister et al. 2005, Moffett et al. 2002, Rairdan et Moffett 2006). La première dépend d'un domaine fonctionnel NBS, soutenant le modèle d'échange de nucléotides qui est nécessaire pour libérer le potentiel de signalisation de l'extrémité N-terminale. La deuxième interaction ne nécessite pas un domaine NB fonctionnel et semble être médiée principalement par le sous-domaine ARC-1 (Rairdan et Moffett 2006).

Un modèle proposé pour l'activation d'une protéine CC-NBS-LRR, comme *Rx*, est basé sur l'interaction observée entre les domaines LRR et NB-ARC. La reconnaissance de l'effecteur (directe ou indirecte) produirait un changement dans l'interface d'interaction entre les domaines LRR et ARC-1, permettant l'échange de nucléotides dans le domaine NB-ARC. Cet échange de nucléotides entraînerait un changement conformationnel des domaines NB-ARC et N-terminal, fournissant ainsi les moyens de convertir la reconnaissance en signalisation et d'induire la réaction de résistance (Rairdan et Moffett 2006, Tameling et Takken 2008).

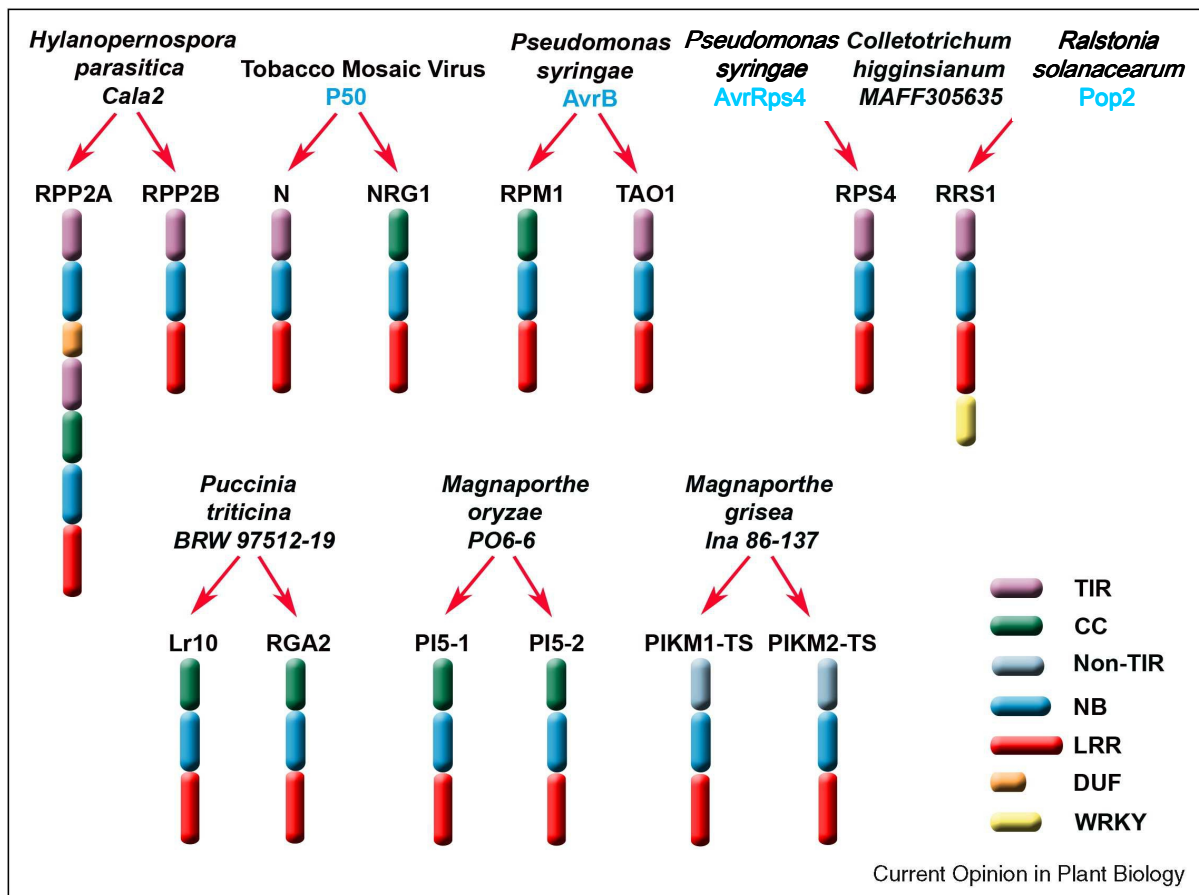
### **1.2.7. Les protéines NBS-LRR font partie de complexes protéiques**

Les premiers modèles construits pour expliquer le déclenchement d'une réaction de résistance étaient relativement linéaires et impliquaient une cascade de réactions faisant suite à la reconnaissance d'un effecteur par un gène de type NBS-LRR. Les voies de signalisation décrites impliquaient soit l'acide salicylique (SA) pour la résistance aux pathogènes biotrophes, soit l'acide jasmonique et l'éthylène (JA/ET) pour la résistance aux pathogènes nécrotrophes (Glazebrook 2005).

Les progrès réalisés ces dernières années dans le domaine de la génomique, de l'interactomique et dans l'analyse de mutants, permettent de décrire l'immunité chez les plantes, de plus en plus en terme d'interactions protéiques, plutôt que d'interactions génétiques (Gassman et Bhattacharjee 2012). Des plantes d'*Arabidopsis*, mutées dans des gènes spécifiques des trois voies de signalisation SA, JA et ET, mettent en évidence que ces trois secteurs de signalisation interagissent et contribuent positivement à la résistance tant contre des pathogènes biotrophes que nécrotrophes (Tsuda et al. 2010). Des expériences d'interactions protéine-protéine en système double-hybride (Y2H) ont révélés que les effecteurs de plusieurs pathogènes pouvaient avoir des cibles identiques, et que ces cibles constituaient souvent des nœuds d'interactions entre de nombreuses protéines (Mukhtar et al. 2011).

#### **1.2.7.1. La protéine EDS1 est nécessaire aux résistances médiées par les gènes TIR-NBS-LRR**

La protéine EDS1 constitue un bon exemple de ces nœuds d'interactions. EDS1 a été initialement identifiée dans un crible de mutants sensibles à plusieurs isolats de *H. arabidopsidis* (Parker et al. 1996.). Cette protéine est hautement conservée chez les plantes et code pour une protéine lipase-like, dont la fonction biochimique est inconnue (Falk et al. 1999, Liu et al. 2002, Peart et al. 2002, Wiermer et al. 2005, Hu et al. 2005, Gao et al. 2010). Des mutations dans EDS1 réduisent le niveau de résistance basale des plantes face aux agents pathogènes virulents (Wiermer et al. 2005). EDS1 contribue également à la résistance non hôte d'*Arabidopsis thaliana* contre la bactérie *Erwinia amylovora* (Moreau et al. 2012). La résistance spécifique (ETI), conférée par les gènes de la famille TIR-NBS-LRR, est abolie dans les plantes où l'expression d'EDS1 est inactivée (Liu et al. 2002, Wirthmueller et al. 2007). L'hypothèse qu'EDS1 constituait un élément aval, commun aux voies de signalisations activées par les gènes TIR-NBS-LRR avait été émise. Cependant, il a été montré récemment



**Figure 1.9 :** Paires de gènes NBS-LRR nécessaires à l'expression d'une résistance. La figure montre la structure en différents domaines des gènes NBS-LRR conférant la résistance par paires chez *Arabidopsis* et le tabac (en haut) et chez le blé et le riz (en bas). Les lettres noires indiquent les pathogènes correspondant et les lettres bleues indiquent les produits Avr de ces pathogènes (Eitas et al. 2010).

que chez *Arabidopsis*, EDS1 est une cible directe d'au moins deux effecteurs bactériens non homologues, AvrRps4 et HopA1 et qu'EDS1 est gardée par au moins trois protéines TIR-NBS-LRR : RPS4, RPS6 et SNC1 (Bhattacharjee et al. 2011, Heidrich et al. 2011). EDS1 interagit également avec plusieurs protéines, en particulier PAD4 (Phytoalexin Deficient 4) et SAG101 (Senescence Associated Gene 101), dans plusieurs compartiments cellulaires (Aarts et al. 1998, Feys et al. 2005). Ainsi, différents complexes impliquant EDS1 pourraient avoir des rôles soit dans les résistances de types ETI, soit dans les résistances de type PTI (Gassman et Bhattacharjee 2012).

### **1.2.7.2. Les protéines chaperones HSP90-RAR1-SGT**

Les protéines NBS-LRR chez les plantes ont besoin d'un complexe de protéines chaperones conservées pour maintenir une conformation, un taux d'accumulation et une régulation appropriée. Les principaux composants de ce complexe incluent des protéines de choc thermique (HSP90), leurs co-chaperones RAR1 (Required for MLA12 Resistance 1) et le suppresseur de l'allèle G2 de SKP1 (SGT1) (pour revue voir Shirasu, 2009). Chaque composant interagit par paire avec les deux autres, formant un complexe stable (Shirasu 2009, Zhang et al. 2010). Les protéines HSP90 fonctionnent comme un homodimère et RAR1 ferait un pont entre les extrémités N-terminales de chaque monomère de HSP90 pour réguler les états conformationnels «ouvert» et «fermé», qui régulent la stabilisation (Zhang et al. 2010, Hubert et al. 2009). En général, HSP90 et RAR1 fonctionnent comme des régulateurs positifs de l'accumulation des protéines NBS-LRR (Shirasu 2009).

En revanche, les protéines SGT1 peuvent réguler les protéines NBS-LRR, soit positivement soit négativement (Shirasu 2009, Azevedo et al. 2007, Holt et al. 2005). Les doubles fonctions supposées de SGT1 et la conclusion selon laquelle il peut s'associer avec les composants du complexe ubiquitine-ligase SCF (Skp1-Cullin-F-box) a conduit à l'hypothèse que SGT1 pourrait également réguler le renouvellement des protéines NBS-LRR via le protéasome 26S (Holt et al. 2005, Azevedo et al. 2002).

### **1.2.7.3. Plusieurs NBS-LRR peuvent être nécessaires pour la résistance**

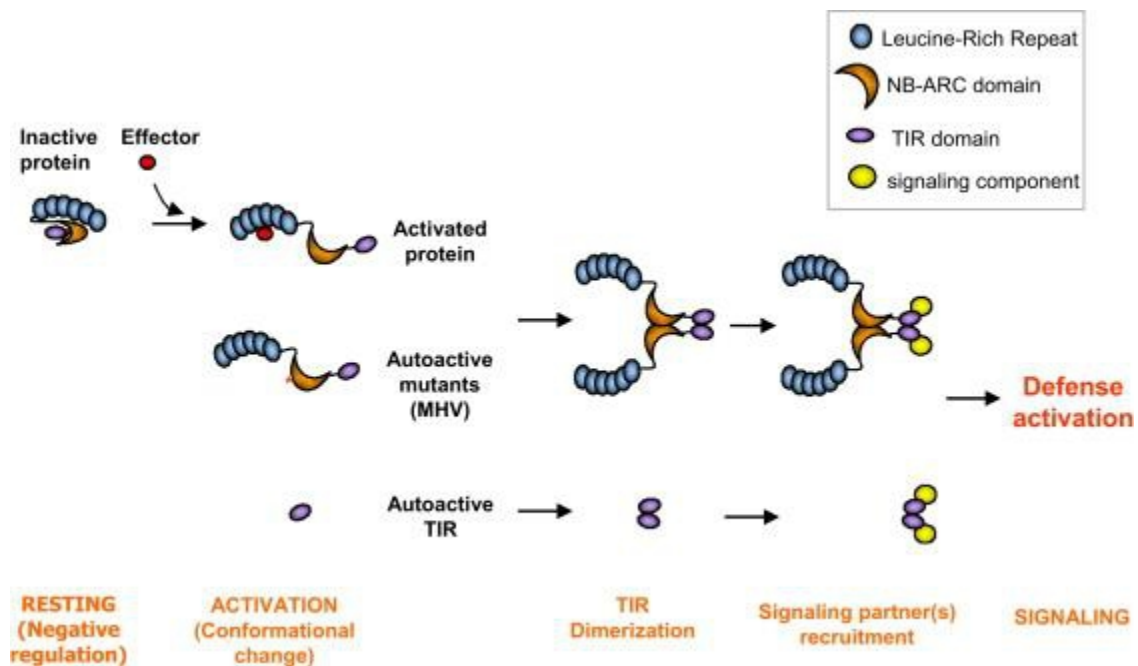
De nombreuses publications récentes ont démontré qu'une paire de gènes NBS-LRR pouvait être nécessaire pour déclencher une résistance contre un isolat de pathogène ou un produit Avr. Ces paires de gènes NBS-LRR peuvent inclure des domaines N-terminaux de même type (TIR ou CC). La figure 1.9 illustre les paires de gènes NBS-LRR nécessaires à

l'expression d'une résistance. Les gènes fonctionnant par paires peuvent être liés génétiquement ou situés sur différents chromosomes. Lorsque les deux gènes NBS-LRR sont nécessaires pour la défense, un des modèles proposés indique qu'ils peuvent former des hétéro-multimères, qui permettraient la détection des agents pathogènes. Des interactions hétérotypiques des deux récepteurs Toll-like (TLR) et NLR ont été démontrés chez les mammifères (Ting et al. 2010, Takeuchi et al. 2002, Hsu et al. 2008). En aval de la perception du produit Avr, l'activation de multiples protéines NBS-LRR peut conduire à une augmentation ou une diversification des voies de signalisation, qui serait nécessaire pour une réaction de défense efficace (Eitas et al. 2010).

La première démonstration du fonctionnement d'une paire de gènes NBS-LRR dans la résistance contre un isolat d'agent pathogène a été effectuée pour les gènes *RPP2A* et *RPP2B* (Sinapidou et al. 2004). Comme il n'y a jusqu'à présent aucune preuve que *RPP2A* et *RPP2B* perçoivent le produit d'un gène Avr unique, *RPP2A* et *RPP2B* pourraient être activés par les produits de plusieurs gènes Avr. La caractérisation des paires de gènes *N-NRG1* (conférant la résistance au virus de la mosaïque du tabac) et *RPM1-TAO1* (conférant la résistance à *Pseudomonas syringae*) a révélé que la résistance aux virus et aux bactéries peut être médiée par une paire de protéines NBS-LRR des sous-classes TIR et CC (Peart et al. 2005, Eitas et al. 2008). Des investigations récentes sur *RRS1* et *RPS4* ont démontré que cette paire de gènes TIR-NBS-LRR est nécessaire à la résistance contre plusieurs pathogènes (Deslandes et al. 2002, Narusaka et al. 2009). Des exemples de paires de gènes CC-NBS-LRR proviennent de l'identification de *Lr10-RGA2* conférant la résistance à la rouille chez le blé et *Pi-5* conférant la résistance à *Magnaporthe oryzae* chez le riz (Loutre et al. 2009, Lee et al. 2009). Enfin, la caractérisation de *Pikm1-TS* et *Pikm2-TS* chez le riz ont démontré que deux gènes NBS-LRR, codant un domaine N-terminal non TIR sont nécessaires pour déclencher la résistance contre un isolat de pyriculariose (Ashikawa et al. 2008).

#### **1.2.7.4. Oligomérisation de protéines NBS-LRR**

Récemment, la détermination des structures cristallines des deux domaines de protéines NBS-LRR a été obtenue : le domaine CC du gène *MLA10* chez l'orge et le domaine TIR du gène *L6* chez le lin (Maekawa et al. 2011 et Bernoux et al. 2011 respectivement). L'obtention de ces structures a montré que chacune est suffisante pour déclencher de façon autonome la signalisation de défense des plantes en formant des homodimères en solution. Chaque fragment de protéines cristallise sous forme de dimère et des mutations dirigées dans



**Figure 1.10 :** Modèle proposé par Bernoux et al. (2011) pour expliquer l'activation des protéines TIR-NBS-LRR.

En l'absence d'effecteur, les interactions intramoléculaires maintiennent la protéine dans une conformation inactive où l'interface de dimérisation du domaine TIR n'est pas exposée. Lors de l'activation de la défense, la régulation négative est libérée, probablement au travers de l'échange de nucléotides dans le domaine NBS et ces changements de conformation exposent le domaine TIR, entraînant une homodimérisation. Il s'ensuit une cascade de signalisations conduisant à l'immunité. Des variants autoactifs tels que le mutant MHV ou le domaine TIR seul, entraînent une réaction de défense sans avoir besoin de reconnaissance d'un effecteur.

l'interface du dimère perturbent l'activité de dimérisation *in vitro* et l'activité de signalisation *in planta*. Ces indices soutiennent un modèle où l'oligomérisation du domaine de signalisation est nécessaire pour activer les réactions de défense (Maekawa et al. 2011, Bernoux et al. 2011).

L'oligomérisation semble être nécessaire pour la signalisation d'au moins cinq récepteurs immunitaires de plantes différentes. Dans le cas des trois protéines CC-NBS-LRR, un dimère inactif est présent avant l'activation, tandis que la dimérisation des deux TIR-NBS-LRR semble être associée à l'activation (Figure 1.10). La protéine MLA chez l'orge contre l'effecteur AvrA10, Rx chez la pomme de terre contre la protéine du virus X et RPM1 chez *Arabidopsis* contre l'effecteur AvrB sont des exemples de protéines CC-NBS-LRR. Pour les protéines TIR-NBS-LRR nous avons comme exemple la protéine L6 chez le lin contre l'effecteur AvrL567 de la rouille. Cela peut refléter une différence fondamentale entre ces deux classes de protéines, mais une analyse plus approfondie avec des exemples supplémentaires de chacun seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse (Bernoux et al. 2011).

### **1.2.8. Localisation subcellulaire des protéines NBS-LRR**

Au cours des cinq dernières années, de nombreuses études ont démontré l'importance du déplacement des récepteurs et des composants immunitaires entre le cytoplasme et le noyau pour l'activation de la résistance (García et Parker 2009, Deslandes et Rivas 2011, Meier et Somers 2011). En effet, l'accumulation dans le noyau des protéines NBS-LRR nucléo-cytoplasmiques, déclenchée par les effecteurs, est nécessaire pour une induction efficace des réponses de défense. C'est le cas pour les gènes *MLA10* chez l'orge, *N* chez le tabac et *RPS4* et *SNCI* chez *Arabidopsis* (Burch-Smith 2007, Wirthmueller et al. 2007). Ces observations ont conduit à un modèle où la perception d'un effecteur du pathogène induit l'accumulation des récepteurs immunitaires dans le noyau où elles activent les réponses immunitaires de signalisation grâce à une reprogrammation transcriptionnelle (Wiermer et al. 2007).

Cependant, deux études récentes ont démontré que chez la pomme de terre, la protéine nucléo-cytoplasmique Rx (NBS-LRR) active des réponses immunitaires dans le cytosol, et même nécessite des pools cytosoliques et nucléaires pour la régulation correcte de son activité (Slootweg et al. 2010, Tameling et al. 2010). Rx interagit avec la protéine cytosolique Ran



GTPase activation 2 (RanGAP2) (Tameling et Baulcombe 2007, Sacco et al. 2007), et cette interaction semble contrôler l'équilibre du pool nucléo-cytoplasmique de la protéine Rx. La surexpression de la protéine RanGAP2 séquestre Rx dans le cytosol, tandis que l'expression d'une version modifiée de RanGAP2 fusionnée à un signal de localisation nucléaire (NLS) conduit à l'accumulation de Rx dans le noyau (Tameling et al. 2010). Toutes les protéines NBS-LRR ne montrent pas une localisation nucléaire. Gao et al. (2011) ont montré que l'exclusion nucléaire, ou l'attachement direct à la membrane n'a pas compromis l'activité RPM1. Ces résultats suggèrent fortement que l'activation et la signalisation de RPM1 se produit au niveau la membrane plasmique et qu'elle initie une voie de signalisation cytosolique.

Garcia et al. (2010) ont montré que deux pools d'EDS1, un pool cytosolique et un pool nucléaire, sont nécessaires dans la coordination des réponses immunitaires. Lors de la perception des agents pathogènes, la reprogrammation transcriptionnelle associée à la défense dépend de l'accumulation nucléaire d'EDS1.

### **1.2.9. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes NBS-LRR**

Etant donné l'intensité de la réaction déclenchée par l'activation d'un gène NBS-LRR, les mécanismes conduisant à l'activation ou l'inactivation de ces gènes doivent être rigoureusement contrôlés. Il a été démontré qu'une modification d'un faible nombre d'acides aminés suffisait à modifier le spectre d'action d'un gène NBS-LRR (Ellis et al. 1999) et à abolir une réaction de résistance ou au contraire à activer constitutivement une réaction de nécrose conduisant à la mort de la plante (Bendahmane et al. 2002, Bryan et al. 2000, Rairdan et Moffett 2007). Les informations sur la régulation de l'activité des gènes NBS-LRR au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel sont encore fragmentaires voire contradictoires. Les données obtenues sur certains modèles montrent que le niveau de résistance peut être fonction du niveau d'expression du gène, que ce niveau d'expression peut être constitutif ou induit lors de l'infection par le pathogène. Dans le cas du gène *Rb*, conférant la résistance à *P. infestans* chez la pomme de terre, le niveau de résistance augmente avec le niveau d'expression du gène *Rb*, dans des plantes transgéniques (Bradeen et al. 2009). Le niveau d'expression du gène *Bs4*, conférant la résistance à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* chez la tomate, n'est pas affecté par l'infection par la bactérie (Schornack et al. 2005), contrairement aux gènes *Mla6* et *Mla13*, conférant la résistance à l'oïdium chez l'orge

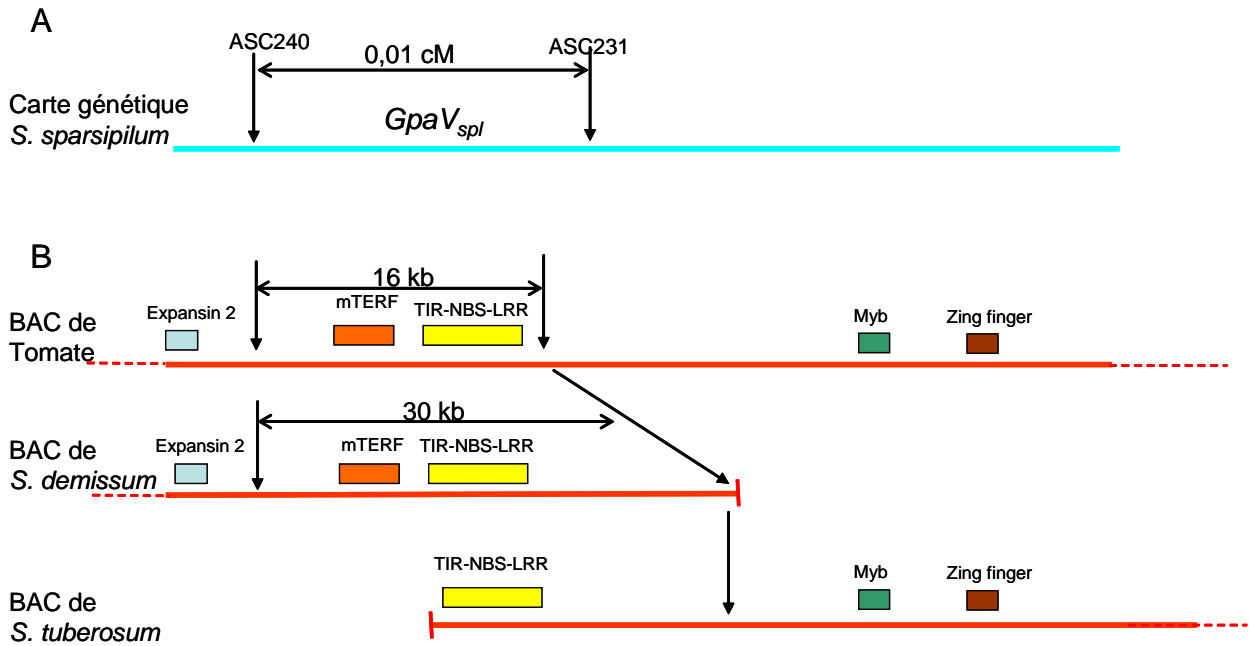
(Halterman et al. 2003), et au gène *Hero*, conférant la résistance au nématode à kyste *G. rostochiensis* chez la tomate (Sobczak et al. 2005).

L'épissage alternatif est fréquent chez les gènes TIR-NBS-LRR et la présence d'ARNm différemment épissés peut être indispensable à l'expression de la résistance, comme c'est le cas pour le gène *N*, conférant la résistance au virus de la mosaïque (TMV) chez le tabac (Dinesh-Kumar et Baker 2000), ou pour le gène *RPS4*, conférant la résistance à la bactérie *Pseudomonas syringae* (Zhang et Gassmann 2003). Dans d'autres cas, comme celui du gène *L6*, conférant la résistance à la rouille du lin, l'épissage alternatif ne semble pas indispensable à l'expression de la résistance. En effet, les plantes sensibles, transformées avec le gène sans ses introns montrent un niveau de résistance équivalent aux plantes transformées avec le gène comprenant les introns (Ayliffe et al. 1999).

### **1.2.10. Autres rôles des gènes NBS-LRR que dans la résistance**

Les protéines NBS-LRR peuvent avoir d'autres fonctions que la perception des agents pathogènes (Tameling et Joosten 2007). Certains gènes sont impliqués dans des cascades de signalisation importantes pour d'autres processus cellulaires tels que la tolérance à la sécheresse, le développement et la photomorphogenèse (Chini et al. 2004, Hewezi et al. 2006, Bouzidi et al. 2002, Faigon-Soverna et al. 2002).

Par exemple, la protéine *ADR1* est impliquée dans la tolérance à la sécheresse (Chini et al. 2004). Une autre protéine NBS-LRR, la protéine *PLFOR48s* du tournesol pourrait être impliquée dans des processus différents de l'immunité innée. Quatre lignées de tournesol transgéniques contenant une construction *PLFOR48* ADNc antisens ont montré de graves anomalies de développement, tels que le ralentissement de la croissance et une réduction de la dominance apicale (Hewezi et al. 2006, Bouzidi et al. 2002). Chez *Arabidopsis*, une autre protéine TIR-NBS-LRR la protéine *CSA1* n'a pas été directement associée à l'immunité innée des plantes. Bouzidi et al. (2002) ont montré que cette protéine pourrait être impliquée dans la signalisation par le phytochrome B (photomorphogenèse).



**Figure 1.11 :** Atterissage chromosomique sur les séquences de clones BAC disponibles dans les bases de données en 2009. Les marqueurs ASC240 et ASC231 flanquent le locus *GpaV<sub>spl</sub>* sur la carte génétique (A). Les séquences homologues à ces marqueurs sont séparées de 16 kb chez la tomate et de 30 kb chez *S. demissum* sur la carte physique (B). Un gène possédant un domaine mTERF et un gène TIR-NBS-LRR ont été annotés dans cet intervalle. La séquence du clone BAC de *S. tuberosum* est interrompue en amont du gène TIR-NBS-LRR.

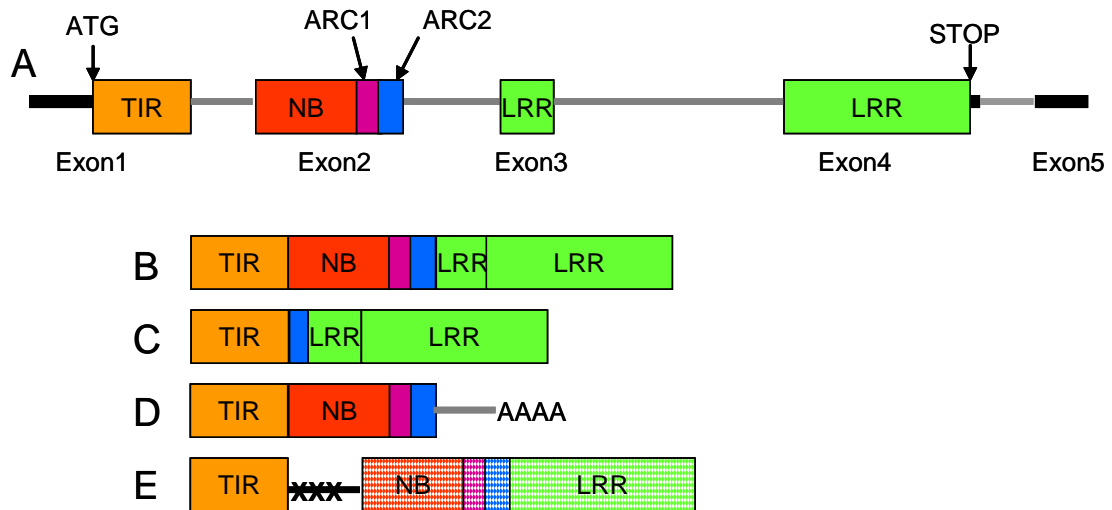
### 1.3. Etat des travaux à mon arrivée dans l'équipe RDS pour le pathosystème pomme de terre-nématodes

Les travaux de cartographie et de clonage positionnel du gène sous-jacent au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* ont été menés par trois unités INRA en étroite collaboration : GAFL à Avignon (84), APBV à Ploudaniel (29) et BiO3P au Rheu (35).

La détection de QTL de résistance à *G. pallida* à partir du clone spl329.18, de l'espèce sauvage diploïde *S. sparsipilum* apparentée à la pomme de terre, a montré que l'expression d'un QTL à effet fort appelé *GpaV<sub>spl</sub>*, ainsi que l'expression d'un QTL à effet faible appelé *GpaXI<sub>spl</sub>*, était indispensable pour l'obtention d'une résistance de haut niveau. L'effet du QTL *GpaV<sub>spl</sub>* sur la résistance à *G. pallida*, évalué par le nombre de kystes néoformés en une saison de culture, est très fort ( $R^2 = 76\%$ ) (Caromel et al. 2005). Cette diminution du nombre de kystes, conférée par le QTL *GpaV<sub>spl</sub>*, s'explique par une dégénérescence du syncytium du nématode au bout de quelques jours, entraînant le développement de la majorité des nématodes en mâle (Sobczak et al. 2008). Dans une plante sensible, 90 % des nématodes se développent en femelles et c'est le corps de la femelle renfermant plusieurs centaines de J2 en diapause qui formera le kyste.

Le QTL *GpaV<sub>spl</sub>* a été cartographié sur le chromosome V de spl329.18 dans un intervalle de 5 cM, en utilisant une descendance en ségrégation de 239 clones diploïdes de pomme de terre (descendance 96D31+00D53), entre deux marqueurs (GP21-SCAR et TG432P-CAPS) (Caromel et al. 2005). Un modèle statistique permettant de tenir compte de l'effet du QTL à effet faible *GpaXI<sub>spl</sub>*, ségrégeant également dans la descendance de cartographie, a été développé. Grâce à ce modèle, des seuils ont été définis pour, à partir d'un nombre de kystes, classer les individus recombinant dans l'intervalle de confiance du QTL en "résistant à *GpaV<sub>spl</sub>* " vs. "sensible à *GpaV<sub>spl</sub>* ", quelque soit leur génotype au QTL à effet faible *GpaXI<sub>spl</sub>*.

Des marqueurs ont été définis à partir de séquences d'EST de pomme de terre et de clones BAC de tomate, de *Solanum demissum* et de *S. tuberosum* (Rapport de stage de Laure Bruguier, 2007). Les marqueurs, cartographiés dans l'intervalle de confiance du QTL *GpaV<sub>spl</sub>*, ont été génotypés sur 1393 clones supplémentaires, issus du croisement des mêmes parents que la population ayant servi à la cartographie des QTL : spl329.18 et Caspar H3. Les individus recombinants ont été phénotypés selon le même protocole que pour la cartographie



**Figure 1.12 :** Structures intron-exon des protéines codées par le gène TNL localisé au locus *GpaV<sub>spl</sub>*, déterminée par RT-PCR et RACE.

**A)** Représentation de l'ADN génomique avec les différents introns et exons. Les domaines protéiques détectés sur les différents exons sont indiqués. Les régions 5' et 3'UTR sont symbolisées par des traits noirs. Les introns sont symbolisés par des traits gris.

**B)** Protéine TNL complète résultant d'un épissage normal.

**C)** Protéine résultant de l'exclusion d'une grosse partie de l'exon 2, suite à l'utilisation d'un site alternatif accepteur d'épissage situé dans le domaine ARC2

**D)** Protéine résultant de sites de polyadénylation prématurés dans l'intron 2.

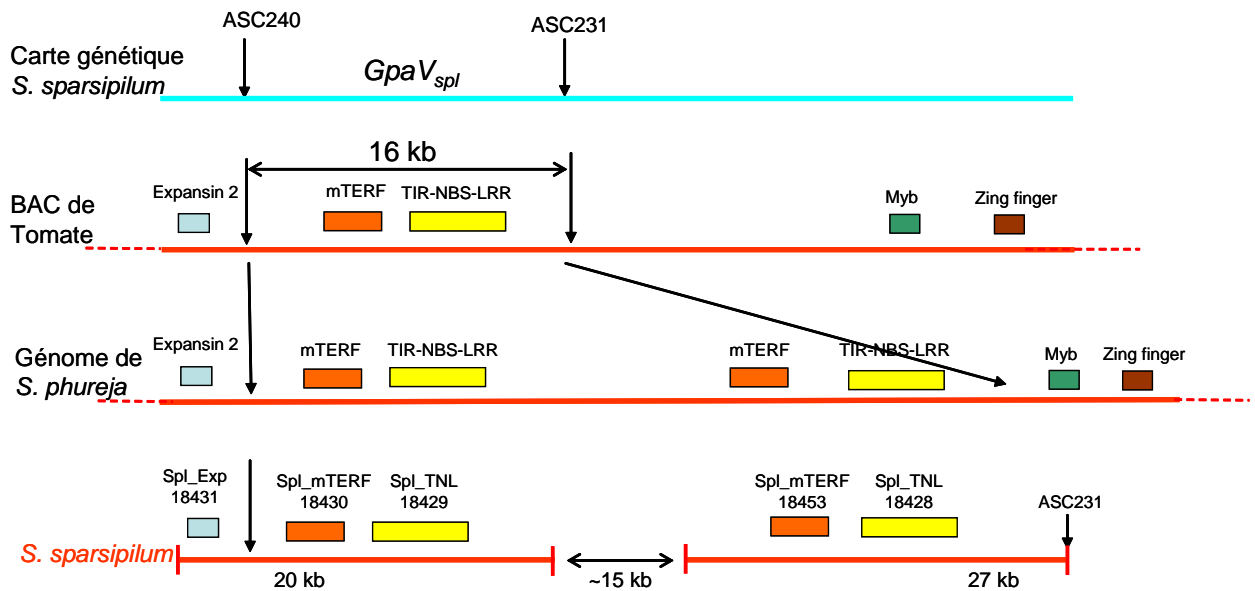
**E)** Protéine résultant de la rétention de l'intron 1 et de l'exclusion de l'exon 3. Seul le domaine TIR peut être traduit.

de QTL. Les données quantitatives ont été converties en données qualitatives. L'information conjointe des données de génotypage et de phénotypage a permis de localiser le locus de résistance *GpaV<sub>spl</sub>* entre les marqueurs ASC231 et ASC240 (Figure 1.11).

Le marqueur ASC231 et deux marqueurs coségrégant avec la résistance sont situés à une extrémité du clone BAC de *S. tuberosum*. Sur la séquence du clone BAC de *S. demissum*, les deux marqueurs ASC231 et ASC240 sont distants de 30 kb. Chez la tomate, dont la séquence d'un clone BAC était également disponible, les deux marqueurs ASC231 et ASC240 sont distants de 16 kb. Dans cet intervalle, deux gènes ont été annotés : le premier appartient à la famille des TIR-NBS-LRR (TNL), famille de gènes de résistance classiques, et le second appartient à la famille des « mitochondrial, transcription termination factor » (mTERF), dont l'implication dans des mécanismes de résistance n'a jamais été démontrée. Ces deux gènes ont également été annotés sur le clone BAC de *S. demissum*. Le clone BAC de *S. tuberosum* est interrompu juste en amont du gène TNL et ne comporte donc pas le gène mTERF ni le marqueur ASC240 (Figure 1.11).

Un fragment de 200 pb, ciblant le domaine LRR du gène TNL, a été cloné dans un vecteur permettant l'extinction de gènes par RNAi. Une plante de la population de cartographie, possédant les allèles de résistance aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>*, a été transformée avec ce vecteur (rapport de stage d'Aurore Vernet, 2008). L'orthologue du gène TNL a été amplifié avec des amorces définies sur les séquences conservées entre la tomate et *S. demissum* pour l'amorce 5', et conservées entre la tomate, *S. demissum* et *S. tuberosum* pour l'amorce 3'. Les fragments amplifiés ont été clonés dans un vecteur binaire et séquencés (résultats Adrien Speck et Bernard Caromel, Projet NemaQTL).

La séquence codante du gène TNL a été déterminée par RT-PCR. Le gène comprend 5 exons et 4 introns. L'exon 1 comporte la région 5' non traduite (5'UTR) et le domaine TIR, l'exon 2 comporte le domaine NB-ARC, l'exon 3 comporte le début du domaine LRR, l'exon 4 comporte la fin du domaine LRR jusqu'au codon stop et le début de la région 3' non traduite (3'UTR) et l'exon 5 comporte la fin de la région 3'UTR. Des phénomènes d'épissage alternatif et des sites de polyadénylation prématuré ont été identifiés (Figure 1.12).

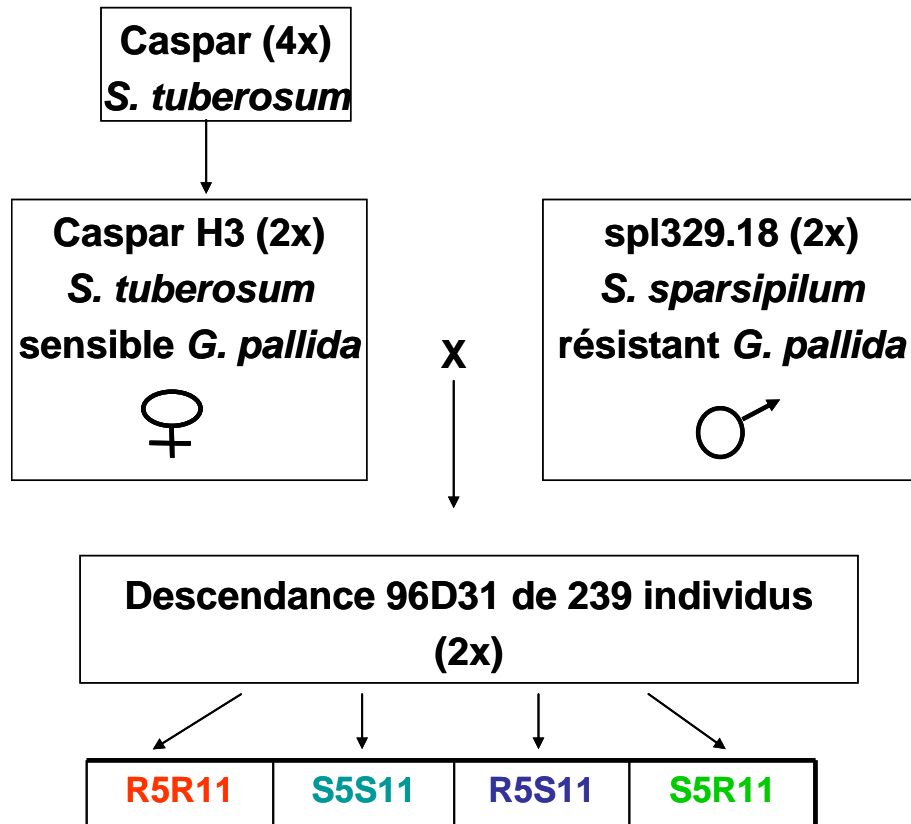


**Figure 1.13 :** Le locus *GpaV* est dupliqué chez *S. phureja* et chez *S. sparsipilum*. Au niveau du locus *GpaV*, cartographié génétiquement entre les marqueurs ASC240 et ASC231 chez *S. sparsipilum*, deux gènes ont été annotés sur le génome de la tomate. Le fragment génomique comprenant ces deux gènes est dupliqué sur les génomes de *S. phureja* et de *S. sparsipilum*.

## **1.4. Le locus comportant les deux gènes candidats TNL et mTERF sous-jacents au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* est dupliqué chez *S. phureja* et *S. sparsipilum***

En 2011, les données du séquençage du génome de la pomme de terre ont été rendues publiques (Xu et al. 2011). Ces données ont permis de mettre en évidence que le locus comprenant les deux gènes mTERF et TNL chez la tomate était dupliqué en tandem dans un intervalle d'environ 60 kb chez le clone de l'espèce de pomme de terre séquencée, *Solanum phureja*. Les trois quart du locus, pour l'allèle de résistance de *S. sparsipilum*, ont été amplifiés par PCR longue distance et séquencés. Les séquences obtenues comprennent les deux marqueurs flanquant le locus *GpaV<sub>spl</sub>* (ASC240 et ASC231) et les deux dupliquats de gènes annotés: Spl\_mTERF18430 - Spl\_TNL18429 et Spl\_mTERF18453 - Spl\_TNL18428 (Figure 1.13). Les deux dupliquats sont séparés par environ 15 kb de séquences répétées. Les deux gènes que nous avons utilisés pour l'étape d'analyse fonctionnelle sont les gènes Spl\_mTERF18430 et Spl\_TNL18428.





**Figure 2.1 :** Matériel végétal utilisé dans la thèse. La population 96D31 a été obtenue suite à un croisement interspécifique entre Caspar H3, clone dihaploïde de *S. tuberosum* sensible à *G. pallida*, et spl329.18, clone diploïde de l'espèce sauvage *S. sparsipilum* résistant à *G. pallida* (Caromel et al. 2005). Les 239 individus issus de ce croisement ont été classés en quatre combinaisons alléliques aux QTL, en fonction de leur génotype aux marqueurs flanquant les QTL : R5R11 pour les individus portant l'allèle de résistance aux deux QTL, S5S11 pour les individus portant l'allèle de sensibilité aux deux QTL, R5S11 pour les individus portant l'allèle de résistance au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de sensibilité au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* et S5R11 pour les individus portant l'allèle sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de résistance au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>*.

## Chapitre 2 : Matériels et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans le cadre de ce travail est un ensemble de clones diploïdes choisis dans la population 96D31 ou des plantes transgéniques. La population 96D31 a été obtenue suite à un croisement interspécifique entre Caspar H3, clone dihaploïde de *S. tuberosum* sensible à *G. pallida*, et spl329.18, clone diploïde de l'espèce sauvage *S. sparsipilum* résistant à *G. pallida*. Les 239 individus issus de ce croisement ont été utilisés précédemment pour la détection des QTL de résistance (Caromel et al. 2005) et ont été classés en quatre combinaisons alléliques aux QTL, en fonction de leur génotype aux marqueurs flanquant les QTL : R5R11 pour les individus portant l'allèle de résistance aux deux QTL, S5S11 pour les individus portant l'allèle de sensibilité aux deux QTL, R5S11 pour les individus portant l'allèle de résistance au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de sensibilité au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* et S5R11 pour les individus portant l'allèle sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de résistance au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* (Figure 2.1).

### 2.2. Populations de *G. pallida*

La population de nématodes utilisée au cours de cette étude est la population Chavornay, collectée en Suisse. Cette population est une des plus agressives sur des clones de pomme de terre possédant des facteurs de résistances originaires de *Solanum vernei* (Mugniéry *et al.*, 1989). C'est une des populations utilisée pour l'inscription de variétés de pomme de terre au catalogue européen.

### 2.3. Transformation génétique

#### 2.3.1. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La transformation de la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* a été effectuée avec un plasmide binaire contenant le fragment d'ADN d'intérêt. Cette transformation a été réalisée par électroporation de bactéries électrocompétentes conservées à -80°C. Pour la transformation nous avons utilisé 20 µl de bactéries électrocompétentes et 10 ng d'ADN plasmidique. Les conditions d'électroporation sont : un voltage 4 Ω et une capacitance de 330 µF. Les échantillons ont été placés ensuite dans 900 µl de SOC (Annexe 1) quelques minutes

**Tableau 2.1 :** Composition du milieu « pomme de terre »

<b>Élément</b>	<b>Quantité pour 1 litre de milieu</b>
K NO <sub>3</sub>	2,69 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	536 mg
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	472 mg
Mg SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	418,6 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	274 mg
KCl	350 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg
Mn SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	16,9 mg
Zn SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	10,6 mg
KI	0,83 mg
Cu SO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,025 mg
Co Cl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,025 mg
Na <sub>2</sub> Mo O <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,25 mg
Myo-inositol	100 mg
Glycine	2 mg
Thiamine HCL	0,5 mg
pyridoxine HCL	0,5 mg
Acide Nicotinique	0,5 mg
SO <sub>4</sub> Fe - 7H <sub>2</sub> O	37,3 mg
Na <sub>2</sub> EDTA	27,8 mg

Le pH est ajusté à 5,8 avec KOH. Selon les types d'utilisation, 25 g/l de saccharose sont rajouté. Le milieu peut être gélifié en règle générale avec 6 g/l de Vitro Agar, et pour les tests de résistance à *G. pallida* avec 5 g/l de Gelrite. Le milieu est autoclavé 20 minutes à 115°C.

et puis étalés sur des boîtes de pétri contenant le milieu LB solide (Annexe 2), supplémenté avec des antibiotiques de sélection appropriés pour chaque plasmide. Les cultures bactériennes sont incubées pendant deux jours à 29°C jusqu'à l'obtention des colonies transformées puis identifiées par PCR.

### **2.3.2. Mise en culture d'*Agrobacterium tumefaciens***

La culture bactérienne est réalisée dans 20 ml de milieu LB liquide contenant les antibiotiques de sélection spécifiques à la souche d'*A. tumefaciens* transformée. La suspension bactérienne est incubée à 28°C à l'obscurité et sous agitation (120 tours par minute) pendant une nuit. La suspension bactérienne est centrifugée à 5000g pendant 10 min, le culot bactérien est repris dans un milieu liquide MS supplémenté avec 200 mg/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,9 mg/l de thiamine et 39 mg/l d'acétosyringone et la DO<sub>600</sub> finale est ajustée à 0,3.

### **2.3.3. Transformation des explants de pomme de terre**

Les explants (entre-nœuds d'environ 1cm) sont découpés et placés au contact de la solution bactérienne pendant 20 min sous agitation douce puis séchés sur papier filtre. Les explants sont ensuite placés dans des boîtes de Pétri sur un milieu "Pomme de terre" (Tableau 2.1) supplémenté avec 0,9 mg/l de Thiamine et 39 mg/l d'Acétosyringone pour la co-culture, puis placés à l'obscurité pendant 48 heures à 24°C. Après cette période de co-culture nécessaire au transfert du gène d'intérêt dans la cellule végétale, les explants sont placés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu pomme de terre (Tableau 2.1) supplémenté en antibiotique de sélection (Kanamycine 300 mg/l et Timentin 225 mg/l) et en hormones (ANA 0,1 mg/l, GA3 0,1 mg/l, BAP 1 mg/l). Ils sont ensuite transférés dans une chambre de culture réglée avec une photopériodicité de 16h/8h et une température de 24/18°C. Le milieu de culture est renouvelé tous les 15 jours. Après 60 jours de culture, les plantes régénérées sont prélevées des explants puis enracinées dans des tubes contenant un milieu pomme de terre.

## **2.4. Tests de résistance à *G. pallida***

### **2.4.1. Dispositif expérimental utilisé lors du test de résistance *in vitro***

#### **2.4.1.1. Préparation des plantes à inoculer**

La population 96D31 et les plantes transgéniques sont préparées et inoculées de la façon suivante. Des plantes cultivées *in vitro* et âgées de 3 semaines, sont découpées en

boutures comprenant un ou deux nœuds et repiquées pendant une semaine sur le milieu Pomme de terre pour initier la formation des racines d'environ 3 mm. Ces boutures enracinées sont transférées dans des boîtes de Pétri, contenant du milieu Pomme de terre (Tableau 2.1) gélifié avec 5 g/l de Gelrite et sans sucre pour éviter toute contamination. Les boîtes de Pétri sont ensuite maintenues verticalement dans la chambre de culture pour favoriser la croissance gravitropique des racines à la surface du milieu de culture gélifié. Après 3 jours, des racines d'environ 3 cm sont inoculées avec des nématodes de *G. pallida* au stade J2. La multiplication des boutures, la mise en culture des plantes et la période d'inoculation des racines par les nématodes, sont réalisés dans une chambre de culture : température 22°C le jour et 16°C la nuit; hygrométrie 70 %; photopériodicité 16 heures/8 heures ; intensité lumineuse de 182  $\mu\text{mol.photon.m}^2.\text{s}^{-1}$ .

#### **2.4.1.2. Préparation des juvéniles J2 de *G. pallida* et inoculation**

*G. pallida* étant un parasite de quarantaine, les kystes sont stockés à 4°C dans des flacons en verre et dans une enceinte fermée afin d'éviter leur dissémination. En vue de l'éclosion des juvéniles au stade J2, des kystes sont immergés dans un verre de montre contenant 2 ml d'exsudat racinaire de pomme de terre pendant 7 à 10 jours. Les nématodes J2 obtenus sont stérilisés en utilisant le protocole de Goverse et al. (2000) simplifié, avec deux solutions contenant chacune deux antibiotiques. La solution 1 contient 0,5 % de streptomycine et 0,5 % de sulfate de pénicilline. La solution 2 contient 0,1 % d'ampicilline et 0,1 % de gentamycine. Le temps de stérilisation est de 20 minutes pour chaque solution. Pour chaque bouture, deux racines d'environ 3 cm sont inoculées, chacune avec 5 nématodes. Après inoculation, les plantes sont mises à croître dans un Phytotron à température constante de 17°C, une hygrométrie 70 %; une photopériode de 16 heures/8 heures et une intensité d'éclairage de 250  $\mu\text{mol.photon.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Les boîtes de Pétri sont disposées verticalement pendant deux jours pour favoriser la pénétration des nématodes dans les racines puis remises à plat jusqu'à la fin de l'expérience.

#### **2.4.1.3. Evaluation du niveau de résistance des plantes inoculées**

Pour comparer les niveaux de résistance lors du test *in vitro*, les racines inoculées des plantes issues de la population 96D31 et des plantes transgéniques ont été prélevées trois semaines après inoculation et colorées à la fuchsine acide. Les racines, dans lesquelles les nématodes sont colorés en rouge par la fuchsine acide, sont ensuite écrasées entre lame et lamelle et observées au microscope. Les nématodes sont classifiés en deux catégories : stade

"femelle" et "autres stades". La catégorie "autres stades" comprend les nématodes développés en mâles ou bloqués aux stades larvaires J2 ou J3. La proportion de femelles observée dans une plante testée a ensuite été comparée à celle observée dans un clone témoin transformé par un gène rapporteur (GUS ou GFP).

#### **2.4.2. Dispositif expérimental utilisé lors du test de résistance en pot**

Le test de résistance en pot à *G. pallida* permet de mesurer le nombre de kystes néoformés sur une plante de pomme de terre après un cycle complet du nématode. Il est réalisé sur 4 plantes par génotype. Les tubercules sont plantés individuellement dans un pot contenant 400 gr d'un mélange de terreau et de terre franche, auxquels sont ajoutés 10 kystes de *G. pallida*. Ce nombre de kystes est suffisant pour obtenir, après éclosion, 5 à 10 larves de nématode par gramme de sol. Les plantes sont mises en culture en serre de quarantaine. Un cycle complet de culture est effectué afin de laisser le temps aux nématodes de se développer et de s'enkyster. Au bout de 4 mois de culture, le contenu de chaque pot est lavé et tamisé afin de permettre le comptage de kystes néoformés.

### **2.5. Observations macro et microscopiques**

Pour visualiser la présence ou l'absence des nématodes dans les racines inoculées et pour localiser l'expression du gène rapporteur GFP plusieurs méthodes d'observations macro et microscopiques ont été utilisées.

#### **2.5.1. Coloration des nématodes à la fuchsine acide**

Une coloration à base de fuchsine acide a été réalisée pour visualiser et dénombrer les nématodes à différents stades de leur développement dans les racines inoculées par les nématodes. Les racines sont d'abord immergées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1 % pendant 5 minutes, puis 25 secondes dans une solution de fuchsine acide (0,1 % dans de l'acide acétique à 30 %) dans un bain-marie bouillant à 100°C. Après rinçage dans de l'eau distillée les racines sont montées entre lames et lamelles dans une goutte de glycérol à 30 % puis observées à l'aide d'un microscope photonique et photographiées (Optiphot 2, Nikon).

### **2.5.2. Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie photonique**

Deux jours après inoculation par des nématodes *G. pallida*, les racines transformées sont fixés pendant 24 heures dans un mélange de FAA (formol/acide acétique/alcool 90 %, 1V/1V/8V). Durant la fixation, le vide est réalisé plusieurs fois afin de faciliter la pénétration du fixateur dans les tissus. Cette étape de fixation permet de figer les cellules dans un état proche de celui où elles se trouvaient à l'état vivant. Les échantillons sont ensuite lavés abondamment à l'eau distillée, puis déshydratés progressivement par des bains successifs d'éthanol (70, 85, 95 et 100 %). Les racines déshydratées sont plongés dans un mélange (1 : 1) d'éthanol 100 % et de résine de synthèse (Historésine, kit Technovit 7100, Kulzer) pendant une nuit puis dans de la résine pure pendant 24 heures. Ces échantillons sont ensuite inclus dans la même résine à laquelle est ajouté un durcisseur (kit Technovit 7100, Kulzer) qui induit sa polymérisation à température ambiante.

La confection des coupes (3 µm d'épaisseur) est réalisée, de manière sériée à l'aide d'un microtome à rétraction automatique (Jung-Kulzer Supercut 2065 de Leica) équipé d'une lame en carbure de tungstène. Les sections sont collectées sur des lames porte-objets avant de subir pour certaines une double coloration au réactif de Schiff/Naphtol Blue Black (Annexe 3) et pour d'autres une coloration universelle au bleu de toluidine. La double coloration a l'avantage de colorer les produits polysaccharidiques en rose et les protéines en bleu. Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle dans de l'Acrytol avant d'être observées à l'aide d'un microscope photonique (Olympus BH2) et photographiées (Olympus).

### **2.5.3. Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie à épifluorescence**

Des racines inoculées sont observées sous lumière ultraviolette avec un microscope à épifluorescence (Olympus BH2). Ces racines, non coupées et non colorées, présentent une fluorescence bleue/verte lorsque le gène GFP sous contrôle du promoteur du gène candidat *Spl\_TNL18428* localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* s'exprime. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope photonique (Olympus BH2) équipé d'un dispositif d'observation par épifluorescence et photographiées (Olympus).

## **2.5.4. Observation en microscopie confocale et multiphotonique**

Des racines inoculées sont montées entre lame et lamelle dans une goutte de glycérol à 50 %. L'observation des coupes est réalisée avec un microscope confocal, multiphoton (Zeiss LSM 510 Meta) à la plateforme de microscopie du CIRAD à Montpellier : MRI-PHIV (Montpellier Rio Imaging – Plateforme d’Histocytologie et d’Imagerie cellulaire Végétale). Le microscope confocal et multiphoton a la propriété de permettre une visualisation sur très grande profondeur de champ. Les échantillons sont excités non pas par un seul photon de forte énergie, comme pour la microscopie à épifluorescence, mais par plusieurs photons de faible énergie. L'excitation multiphotonique est réalisée à l'aide d'un laser pulsé dans l'infrarouge. Cette technique permet de limiter les dommages cellulaires causés par des photons de fortes énergies et une meilleure pénétration dans l'échantillon. Ainsi des images en trois dimensions peuvent être reconstituées, à partir de sections optiques. (MRI-PHIV, 2009).

Avant les observations des racines, un échantillon témoin exprimant de façon constitutive la GFP est observé afin d'enregistrer sa fluorescence spécifique et de pouvoir la comparer avec la fluorescence émise dans la zone d'inoculation des racines de pomme de terre transformées.

## **2.6. Analyses moléculaires**

### **2.6.1. Extraction d'ADN**

Environ 100 mg de feuilles fraîches ont été broyées dans l'azote liquide. L'ADN a ensuite été extrait en suivant le protocole décrit par Fulton et al. (1995) et stocké à -20°C.

### **2.6.2. PCR**

#### **2.6.2.1. Vérification de la présence de l'ADN de transfert issu du vecteur pBIN19**

Deux couples d'amorces ont été définies avec le logiciel Primer 3 pour amplifier deux fragments à partir de l'ADN de transfert, intégré dans le génome des plantes transformées. Le fragment SPE83FR est situé du côté de la bordure droite de l'ADN de transfert et amplifie partiellement le gène de résistance à la kanamycine. Les amorces SPE82FR amplifient un fragment situés du côté de la bordure gauche de l'ADN de transfert.



## **Séquence des amorces utilisées pour vérifier la présence de l'ADN de transfert**

Coté bordure droite

SPE083F: GCACAGCTGCGCAAGGAAC

SPE083R: GATGACGCGGGACAAGCC

Coté bordure gauche

SPE082F: CGATGGCCCACTACGTGAAC

SPE082R: TCGCCTTGCAGCACATCC

Les PCR ont été réalisées avec l'enzyme ExTaq (Takara) Environ 40 ng d'ADN ont été ajoutés dans un volume final de 20 µl de milieu réactionnel, composé de tampon ExTaq 1X, 0,4 unité d'enzyme, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de dNTP et 0,5 µM de chaque amorce flanquant le fragment d'intérêt. Les conditions de PCR étaient les suivantes: dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, suivi par 35 cycles à 94°C pendant 30 s; 60°C pendant 30 s, 72°C pendant 30 s et enfin un cycle d'extension finale à 72°C pendant 2 min. L'amplification a été vérifiée par migration de 3 µl de produit PCR dans un gel d'agarose à 1 %, en tampon TAE 1X.

### **2.6.2.2. Amplification du promoteur du gène Spl\_TNL18428**

Le promoteur du gène Spl\_TNL18428 a été amplifié à partir du plasmide contenant le gène complet avec son promoteur en utilisant les amorces suivantes, auxquelles ont été rajoutées des queues attB permettant le clonage en système Gateway :

Amorce F: AAGTAAGCAATTCTTTTCTATGAGTAGAGTC

Amorce R: AGATTCGATTAATTGTCTGAAAAGAAA

La paire d'amorces a été conçue de façon à amplifier le fragment situé immédiatement en aval de la séquence codante du gène précédant et immédiatement en amont du codon d'initiation de la traduction (ATG). Le T<sub>m</sub> de la région spécifique des amorces, calculé à l'aide du logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>), est compris entre 59,5°C et 60°C.

La PCR a été effectuée en utilisant l'ADN polymérase Phusion (Finnzymes, Finlande) en suivant les instructions du fabricant dans un volume final de 20 µl contenant 4 µl de tampon 5X Phusion, 200 µM de chaque dNTP (Promega), 0,2 µM de chaque amorce, 1 ng d'ADN cible et 0,25 unité d'ADN polymérase Phusion. Les conditions de PCR étaient les suivantes: dénaturation initiale à 98°C pendant 30 s, suivie par 35 cycles à 98°C pendant 7 s; 65°C pendant 20 s, 72°C pendant 35 s et enfin un cycle d'extension finale à 72°C pendant 1

min. Les produits de PCR contenant le promoteur du gène Spl\_TNL18428 et des dimer d'amorces ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et le fragment correspondant au promoteur du gène Spl\_TNL18428 a été purifié avec le kit QIAquick (Qiagen).

### **2.6.3. Construction du vecteur portant la construction promoteur Spl\_TNL18428 ::GFP**

Le promoteur du gène Spl\_TNL18428 a été recombiné dans le vecteur d'entrée pDONR / Zeo en utilisant le kit BP clonase II, selon les instructions fournies par le fabricant (Invitrogen). Le produit de la réaction a été utilisé pour la transformation d'*E. coli* (DH10B) et trois colonies transformées ont été prélevées et séquencées pour confirmer que la séquence d'ADN clonée correspondait bien à celle du promoteur. Le promoteur cloné dans le vecteur pDONR a été transféré dans le vecteur de destination pKGWFS7, en utilisant le kit LR clonase II, selon les instructions fournies par le fabricant (Invitrogen). Cette étape a permis la fusion du promoteur cloné dans le vecteur pDONR avec les gènes rapporteurs GFP et GUS (Karimi et al. 2002). Le produit purifié de la réaction LR a été utilisé pour transformer *Agrobacterium tumefaciens* par électroporation.

### **2.6.4. PCR Quantitative**

Un protocole détaillé des conditions de traitement des échantillons et des expériences de RT-qPCR est décrit dans l'article publié dans Plant Molecular Biology Reporter (Castro et al. 2013).

L'expression des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 a été quantifiée avec les amorces Q216 et Q212 respectivement, suivant le protocole décrit dans Castro et al. (2013) avec les modifications suivantes : la température d'hybridation des amorces a été fixée à 62°C au lieu de 60°C pour augmenter la spécificité. Les gammes de dilutions, utilisées pour calculer l'efficacité des PCR, étaient constituées de trois séries de sept points de dilution au 5<sup>ème</sup> d'un plasmide, dans lequel le gène à quantifier avait été cloné (de 200 µg à 12,8 pg de plasmide). Un témoin négatif, constitué de 320 pg de plasmide porteur du second gène TNL (Spl\_TNL18429 dans le cas de la quantification du gène Spl\_TNL18428, et Spl\_TNL18428 dans le cas de la quantification du gène Spl\_TNL18429) a été ajouté sur chaque plaque PCR afin de s'assurer que l'amplification était bien spécifique du gène à quantifier.

Spl\_TNL18428

Q216F : TGTTTACGAGTTCGGGGAGTAA

Q216R : AAAGGTACCAAGAAAAACCGAAAC

Spl\_TNL18429

Q212F : GTTTACGAGTACGTGGGGTTGTT

Q212R : CAAAAGGTACCAAGAAAAACTGAATG

## 2.7. Analyses statistiques

Les fréquences de nématodes développés en femelles, dans l'expérience de mise au point des conditions de test de résistance *in vitro*, ont été analysées par régression logistique avec le logiciel R et par un test de  $\chi^2$  à 1 degré de liberté.

Les fréquences de nématodes développés en femelles sur les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428 lors du test de résistance *in vitro* ont été comparées avec celles obtenue sur le témoin transformé avec un gène rapporteur (GUS ou GFP) par un test de  $\chi^2$  à 1 degré de liberté.

Lors du test en pot, les nombres de kystes retrouvés sur les quatre répétitions de chaque génotype testé ont été comparés aux nombres de kystes retrouvés sur les quatre répétitions du génotype témoin par un test non paramétrique de Mann et Whitney.

Les tests statistiques utilisés pour analyser les résultats obtenus par RT-qPCR sont décrits dans l'article publié dans Plant Molecular Biology Reporter (Castro et al. 2013).

## Chapitre 3 : Analyses fonctionnelles des gènes candidats TIR-NBS-LRR et mTERF localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>*

Un des objectifs de ma thèse est identifier les gènes impliqués dans la résistance à *G. pallida*, conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>*. A l'issue des étapes de cartographie fine et d'atterrissage chromosomique sur des séquences de clones BAC chez la tomate et d'espèces apparentées à la pomme de terre, deux gènes candidats avaient été identifiés chez *Solanum sparsipilum*, source de résistance au nématode utilisée pour cette étude : un gène TIR-NBS-LRR (TNL) et un gène mTERF (chapitre 1.3). En 2011, les données du séquençage du génome de la pomme de terre nous ont permis de mettre en évidence que le locus comprenant les deux gènes candidats mTERF et TNL était en réalité dupliqué chez *S. sparsipilum*. Les 4 gènes ont été nommés Spl\_mTERF18430, Spl\_TNL18429, Spl\_mTERF18453 et Spl\_TNL18428 par analogie avec les numéros de locus annotés sur le génome de *S. phureja* (Figure 1.13). Seuls les gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_mTERF18430 ont fait l'objet d'analyse fonctionnelle par transformation génétique pendant ma thèse. Deux stratégies de transformation génétique ont été utilisées pour étudier l'implication de ces gènes candidats dans la résistance à *G. pallida* : la complémentation fonctionnelle chez les plantes sensibles et l'extinction génique par ARNi chez les plantes résistantes. Pour le gène candidat Spl\_TNL18428 les deux méthodes de validation fonctionnelles ont été utilisées alors que pour le gène candidat Spl\_mTERF18430, seule la complémentation fonctionnelle a été effectuée. Les tests de résistance ont été réalisés *in vitro* et en pot pour les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428 et uniquement en pot pour les plantes transformées avec le gène Spl\_mTERF18430.

### 3.1. Analyse fonctionnelle du gène Spl\_TNL18428

Chez la pomme de terre, l'analyse fonctionnelle des gènes candidats peut être réalisée en utilisant un procédé basé sur la transformation génétique de plantes par des souches d'*A. tumefaciens*. Nous avons utilisé des plantes de la population 96D31, dans laquelle les QTL de résistance ont été détectés, pour les expériences de transformation génétique. Les expériences ont été réparties entre les deux unités INRA GAFL (Avignon) et APBV (Ploudaniel). La transformation d'une plante possédant les allèles de résistance aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>* (R5R11) avec une construction ARNi ciblant le domaine LRR du gène Spl\_TNL18428 a été réalisée à l'UR GAFL avant mon arrivée (Rapport de stage A. Vernet

**Tableau 3.1 :** Efficacité de la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* sur différents génotypes de pomme de terre

<b>Génotype</b>	<b>Combinaisons alléliques aux QTL</b>	<b>Nombre de plantules sélectionnées sur milieu avec kanamycine</b>
96D31.43	S5R11	0
96D31.56	S5R11	0
96D31.75	S5R11	24
96D31.76	S5R11	0
96D31.98	S5R11	0
96D31.103	S5R11	3
96D31.137	S5R11	29

2008). La complémentation de plantes possédant les allèles de sensibilité aux deux QTL (S5S11) a été réalisée à l'UMR APBV (Collaboration L. Chauvin). La transformation de plantes possédant l'allèle de sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de résistance au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* (S5R11) a été effectuée à l'UR GAFL pendant ma thèse.

### **3.1.1. Analyse fonctionnelle par complémentation de plantes sensibles avec le gène Spl\_TNL18428**

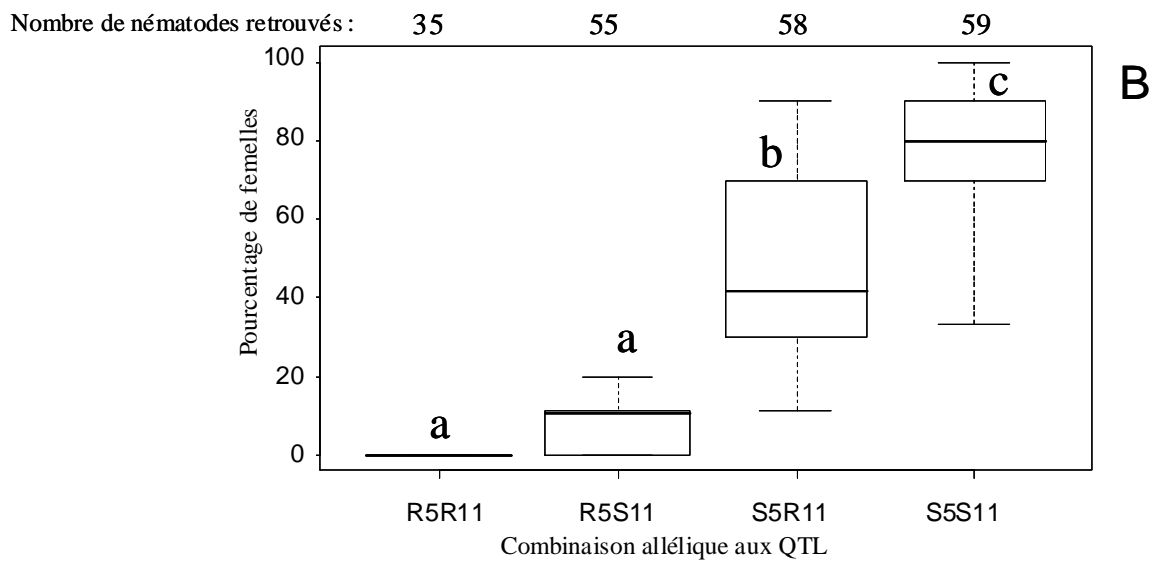
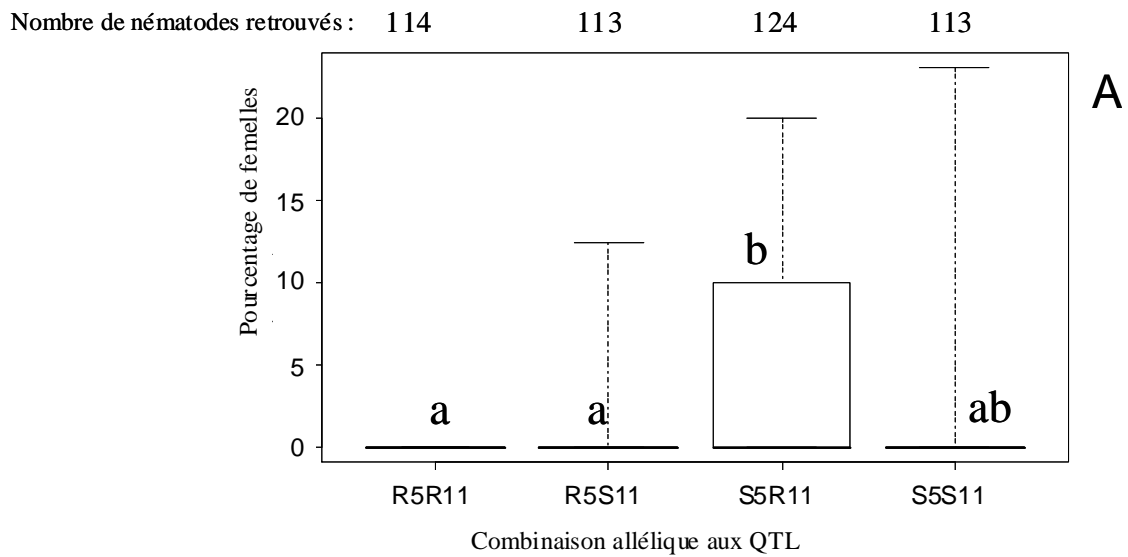
#### **3.1.1.1 Transformation génétique**

Le gène Spl\_TNL18428 a été amplifié par PCR longue distance chez spl329.18 avec 1,7 kb de séquences promotrices et 1,7 kb de séquences terminatrices. Il a été cloné dans le vecteur binaire pBIN19 (Bevan *et al.* 1984). Le vecteur recombiné a été introduit dans la souche d'*A. tumefaciens* GV2260, de type C58, et la transformation génétique a été réalisée comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes.

A partir de 3 clones de génotype S5R11, 56 transformants ont été régénérés sur un milieu contenant de la kanamycine : 24 plantes à partir du clone 96D31.75, 29 plantes à partir du clone 96D31.137 et 3 plantes à partir du clone 96D31.103. (Tableau 3.1). A partir de 3 clones de génotype S5S11, 15 transformants, tous issus du clone 96D31.69, ont été régénérés sur milieu contenant de la kanamycine. L'insertion du transgène dans les événements indépendants de transformation a été vérifiée par PCR. Pour évaluer l'implication du gène Spl\_TNL18428 dans la résistance à *G. pallida*, des tests de résistance ont été effectués *in vitro* et en pot sur 6 événements de transformation issus du génotype 96D31.75 et 3 événements de transformation issus du génotype 96D31.69. Le test *in vitro* a été précédé par une mise au point, effectuée sur des individus issus des quatre combinaisons alléliques aux QTL R5R11, R5S11, S5R11 et S5S11.

#### **3.1.1.2 Mise au point du test de résistance *in vitro***

Les nématodes à kyste de la pomme de terre sont des parasites de quarantaine et l'UMR BiO3P du Rheu était la seule unité INRA habilitée pour la manipulation de *G. pallida*. L'habilitation récente de l'UR GAFL pour la manipulation des nématodes à kyste *G. pallida* est limitée à des expériences *in vitro*, lesquelles nous permettent de distinguer des plantes avec différents niveaux de résistance et de sensibilité. Pour la mise au point des conditions de test de résistance *in vitro*, nous avons utilisé 11 génotypes de la population 96D31,



**Figure 3.1 :** Mise au point du test de résistance in vitro : développement des nématodes dans la chambre de culture CC14 réglée à 22°C (A) et dans le phytotron réglé à 17°C (B). Le trait noir au milieu de la boîte montre la position de la médiane. Les premier et troisième quartiles se situent à la hauteur du dessous et du dessus de la boîte respectivement. Les barres horizontales aux extrémités représentent les valeurs extrêmes. Les lettres en minuscule indiquent les différences significatives entre combinaisons alléliques, calculées par un test de  $\chi^2$  à 1 degré de liberté.

correspondant aux quatre combinaisons alléliques aux QTL : R5R11 (allèle de résistance aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>*), S5S11 (allèle de sensibilité aux deux QTL), R5S11 (allèle de résistance au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et allèle de sensibilité au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>*) et S5R11 (allèle de sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et allèle de résistance au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>*).

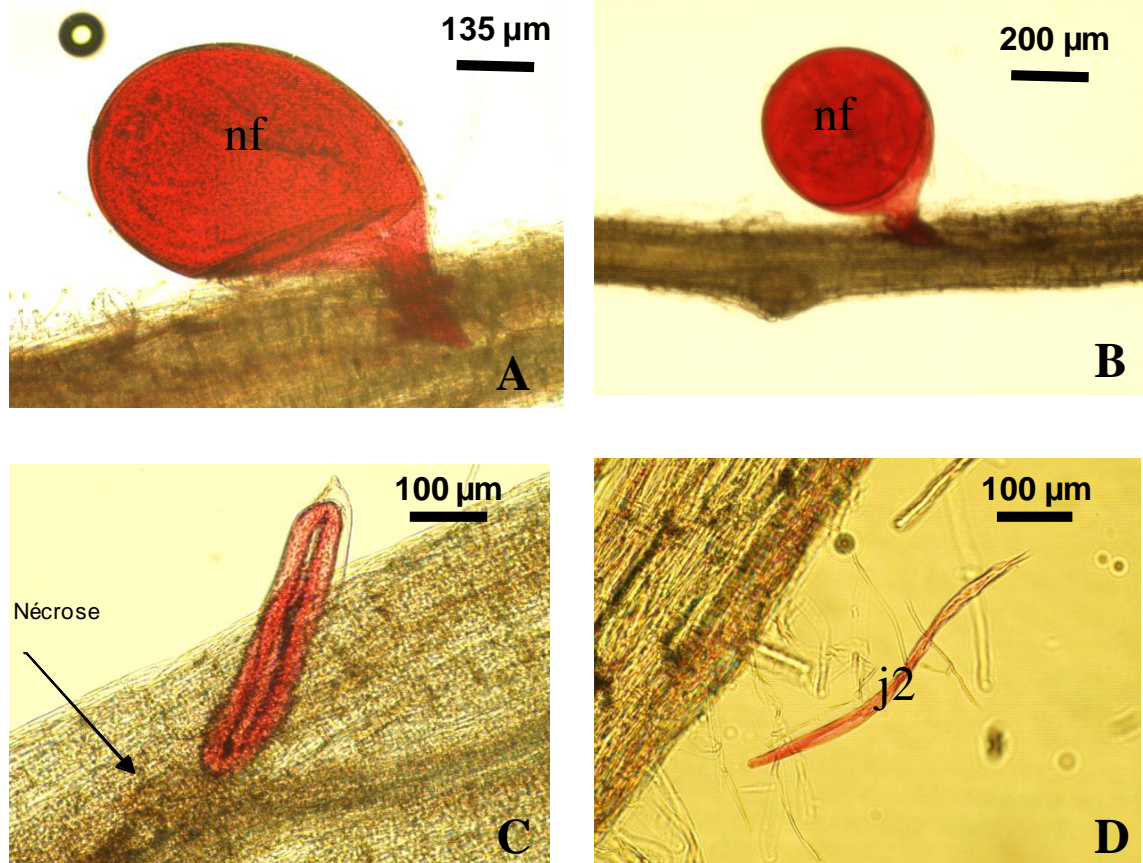
Deux conditions de cultures post-inoculation (à 17°C et à 22°C) ont été testées. Dans les deux expériences, chaque racine a été inoculée avec 5 juvéniles de *G. pallida* au stade J2. Les racines sont issues de boutures mises à pousser en boîte de Pétri. Deux racines ont été inoculées par bouture. Pour tester la première condition de culture (chambre de culture dans laquelle la température était réglée à 22°C), 14 boutures par combinaison allélique, inoculées avec des juvéniles de *G. pallida*, ont été mises à pousser. Pour tester la deuxième condition de culture (phytotron réglé à 17°C), 4 à 6 boutures inoculées ont été mises à pousser.

Au bout de quatre semaines, les racines inoculées ont été prélevées et colorées à la fuchsine acide afin de visualiser les nématodes, qui ont été classés en deux catégories : "nématode au stade femelle" et "nématode à un autre stade". Dans les deux conditions de culture, la majorité des nématodes a été retrouvée dans les systèmes racinaires et nous avons observé des nécroses au niveau de la zone site d'inoculation dans les plantes R5R11, caractéristiques de la réaction de résistance décrite pour les plantes possédant les allèles de résistance aux deux QTL.

L'analyse des résultats par régression logistique a montré un fort effet "conditions de culture" ( $p= 2.9e^{-32}$ ). Les résultats des deux conditions de culture ont été analysés séparément. Dans la chambre de culture réglée à 22°C, les pourcentages de nématodes développés en femelles étaient beaucoup plus faibles que les pourcentages attendus, dans les plantes de combinaisons alléliques S5R11 et S5S11 qui possèdent l'allèle de sensibilité au QTL à effet fort *GpaV<sub>spl</sub>*. Ces pourcentages de femelles étaient également très variables d'une boîte de Pétri à l'autre (Figure 3.1a).

Dans le phytotron réglé à 17°C, les résultats (Figure 3.1b) obtenus sont concordants avec ceux publiés par Caromel et al. (2005). Conformément à ce qui était attendu, un pourcentage de femelles très faible a été retrouvé dans les racines des plantes possédant l'allèle de résistance au QTL *GpaV<sub>spl</sub>*, R5R11 et R5S11. Les résultats obtenus après inoculation des deux combinaisons alléliques ne sont pas significativement différents. En revanche, dans les racines des plantes possédant l'allèle de sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>*, les





**Figure 3.2 :** Nématodes à différents stades de développement

**A :** Nématode femelle au stade J4

**B :** Nématode femelle au stade J4

**C :** Nématode male au stade J4 dans l'exuvie

**D :** Nématode au stade J2

pourcentages de femelles étaient significativement plus importants que dans les racines de plantes possédant l'allèle de résistance. Ces pourcentages sont significativement plus élevés dans les plantes possédant l'allèle de sensibilité aux deux QTL (S5S11) que dans les plantes possédant l'allèle de résistance au QTL à effet faible *GpaXI<sub>spl</sub>* (S5R11). Ces résultats sont illustrés sur la Figure 3.1b.

### 3.1.1.3. Test de résistance *in vitro*

La résistance à *G. pallida* des plantes transgéniques a été évaluée dans un premier temps par un test *in vitro*.

Six événements de transformation indépendants, régénérés à partir du génotype 96D31.75 possédant l'allèle de sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de résistance au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* (S5R11), ont été testés. Ces événements de transformation indépendants ont été nommés 96D31.75.A\_TNL, 96D31.75.B\_TNL, 96D31.75.C\_TNL, 96D31.75.E\_TNL, 96D31.75.F\_TNL et 96D31.75.G\_TNL. Le génotype 96D31.75 transformé avec le gène GUS a été utilisé comme témoin (nommé 96D31.75.GUS). De 16 à 26 racines (2 racines par bouture) ont été inoculées, chacune avec 5 nématodes au stade J2. Les nématodes retrouvés au bout de quatre semaines ont été classés en "stade femelle" et "autre stade" (mâle, J2 ou J3) (Figure 3.2). Les données obtenues sur les six événements de transformation ont été comparées à celles obtenues sur le génotype témoin 96D31.75.GUS, par un test  $\chi^2$  à 1 degré de liberté. Selon le test de  $\chi^2$ , les événements de transformation 96D31.75.A\_TNL, 96D31.75.B\_TNL, 96D31.75.C\_TNL, 96D31.75.E\_TNL, 96D31.75.F\_TNL et 96D31.75.G\_TNL sont significativement différents du témoin utilisé. Ils ont permis le développement d'un nombre significativement plus faible de femelles que dans le témoin (Tableau 3.2 a). L'expérience a été répétée une deuxième fois pour les événements C, E et G et a montré une nouvelle fois des différences très significatives entre ces trois transformants et le témoin (Tableau 3.2 b) Ces expériences indiquent que le gène *Spl\_TNL18428* est impliqué dans la résistance à *G. pallida*.

Trois événements de transformation indépendants, régénérés à partir du clone 96D31.69, possédant les allèles de sensibilité aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>* (S5S11) ont été testés *in vitro* pour leur résistance à *G. pallida*. Le génotype 96D31.69, transformé avec le gène rapporteur GFP (96D31.69.GFP) a été utilisé comme témoin. Dix à seize racines (2 racines par bouture) ont été inoculées, chacune avec 5 nématodes au stade J2. Les données

**Tableau 3.2 :** Pourcentage de nématodes développés en femelles, 21 jours après inoculation, dans les racines des plantes transformées avec le gène candidat Spl\_TNL18428 (test *in vitro*). La significativité des différences entre les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428 et les témoins transformés avec le gène GUS ou GFP a été évaluée par une statistique du khi<sup>2</sup> à 1 degré de liberté.

a) Pourcentage de nématodes développés en femelles pour les plantes issues du génotype 96D31.75 (S5R11) transformées avec le gène candidat Spl\_TNL18428. Les événements indépendants de transformation ont été notés 96D31.75\_A à 96D31.75\_G.

Événement	Effectifs	% femelle	Khi <sup>2</sup>	Probabilité	Significativité
96D31.75_A_TNL	116	21,6	3,9	0,04709	*
96D31.75_B_TNL	101	15,8	8,4	0,00374	**
96D31.75_C_TNL	72	11,1	11,4	0,00071	****
96D31.75_E_TNL	73	15,1	7,5	0,00604	***
96D31.75_F_TNL	90	26,7	1,1	0,28366	N.S.
96D31.75_G_TNL	87	8,0	17,6	0,00003	*****
Témoin 96D31.75_GUS	85	34,1			

b) Répétition du test décrit en a) pour les événements C, E et G

Événement	Effectifs	% femelle	Khi <sup>2</sup>	Probabilité	Significativité
96D31.75_C_TNL	108	10,1	18,5	4,66.10 <sup>-5</sup>	*****
96D31.75_E_TNL	111	2,7	36,7	1,36.10 <sup>-9</sup>	*****
96D31.75_G_TNL	109	1,8	34,7	3,70.10 <sup>-9</sup>	*****
Témoin 96D31.75_GUS	116	12,9			

c) Pourcentage de nématodes développés en femelles pour les plantes issues du génotype 96D31.69 (S5S11), transformées avec le gène candidat Spl\_TNL18428. Les événements indépendants de transformation ont été notés A, B et C.

Événement	Effectifs	% femelle	Khi <sup>2</sup>	Probabilité	Significativité
96D31.69_A_TNL	56	16,0	7,4	0,000636	**
96D31.69_B_TNL	65	16,9	7,4	0,00644	**
96D31.69_C_TNL	44	11,4	9,7	0,00185	**
Témoin 96D31.69_GFP	36	41,7			

**Tableau 3.3 :** Résultats du test de résistance à *G. pallida* en pot sur les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428 sous le contrôle de son propre promoteur. Les kystes néoformés ont été dénombrés après une saison de culture sur 4 plantes par échantillon.

a) Génotype 96D31.75 transformé avec Spl\_TNL18428. Les événements indépendants de transformation ont été notés 96D31.75\_A\_TNL à 96D31.75\_G\_TNL. Les génotypes 96D31.75 et 96D31.75\_GUS ont été utilisés comme témoins non transformé ou transformé avec un gène rapporteur. Le génotype 96D31.46 représente la combinaison de QTL attendue (R5R11) si le gène Spl\_TNL18428 est responsable de la totalité de la résistance conféré par le QTL *GpaV<sub>spl</sub>*.

Clones	Nb kystes				$\Sigma/n$ kystes	Ecart-type
96D31.75_A_TNL	51	73	89	172	96	52,8
96D31.75_B_TNL	101	149	159	402	203	135,2
96D31.75_C_TNL	88	133	159	174	139	37,7
96D31.75_D_TNL	85	99	181	214	145	62,6
96D31.75_E_TNL	121	147	301	331	225	106,3
96D31.75_G_TNL	68	82	90	91	83	10,6
Témoin 96D31.75_GUS	25	114	129	155	106	56,4
96D.31.75 (S5R11)	38	92	142	206	120	71,6
96D.31.46 (R5R11)	0	1	2	3	2	1,3

b) Génotype 96D31.69 transformé avec Spl\_TNL18428. Les événements indépendants de transformation ont été notés 96D31.69\_A\_TNL à 96D31.69\_H\_TNL. Les génotypes 96D31.69 et 96D31.69\_GFP ont été utilisés comme témoins non transformés ou transformés avec un gène rapporteur. Le génotype 96D31.51 représente la combinaison de QTL attendue (R5S11) si le gène Spl\_TNL18428 est responsable de la totalité de la résistance conféré par le QTL *GpaV<sub>spl</sub>*.

Clones	Nb kystes				$\Sigma/n$ kystes	Ecart-type
96D31.69_A_TNL	96	229	236	365	232	109,9
96D31.69_D_TNL	4	176	225	473	220	193,8
96D31.69_E_TNL	292	328	381	455	364	70,8
96D31.69_F_TNL	213	257	364	404	310	89,4
96D31.69_G_TNL	197	324	433	686	410	207,7
96D31.69_H_TNL	59	358	569	648	409	263,2
Témoin 96D31.69_GFP_A	4	19	183	233	110	115,4
Témoin 96D31.69_GFP_B	217	348	387	484	359	110,6
96D.31.69 (S5S11)	274	374	614	875	534	268,3
96D.31.51 (R5S11)	4	4	5	19	8	7,3

obtenues sur les trois événements de transformation indépendants (96D31.69.A\_TNL, 96D31.69.B\_TNL et 96D31.69.C\_TNL) ont été comparées à celles obtenues sur le génotype témoin par un test de  $\chi^2$  à 1 degré de liberté. Selon le test de  $\chi^2$ , les trois événements de transformation ont permis le développement d'un nombre significativement plus faible de femelles que le témoin (Tableau 3.2 c).

#### 3.1.1.4. Test de résistance en pot

Malgré que les résultats du test *in vitro* indiquent que le gène Spl\_TNL18428 est impliqué dans la résistance à *G. pallida*, les pourcentages de nématodes se développant en femelles dans les racines des plantes transgéniques, lors de ce test sont plus élevés que ceux observés par Caromel et al (2005) sur des plantes R5R11 et R5S11, portant l'allèle de résistance au QTL *GpaV<sub>spl</sub>*. Afin de vérifier le phénotype de résistance observé lors du test *in vitro*, les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428 ont été testées en pot durant une saison de culture. Cette vérification a nécessité la production de tubercules à APBV (collaboration Laura Chauvin) et la réalisation du test en serre de quarantaine à BiO3P (collaboration Sylvain Fournet). Le test en pot a été réalisé sur des plantes inoculées avec 10 kystes de *G. pallida* et cultivées pendant un cycle végétatif complet. Cinq des six événements de transformation indépendants, régénérés à partir du génotype 96D31.75 S5R11 ont été testés (Tableau 3.3 a). L'événement 96D31.75.F n'a pas été utilisé parce qu'il n'a pas montré de différence significative avec le témoin lors du test *in vitro* (Tableau 3.2 a). Le génotype 96D31.75 transformé avec le gène GUS (nommé 96D31.75.GUS) a été utilisé comme témoin. Le tableau 3.3 a) présente les nombres de kystes extraits des racines des six événements transformés avec le gène Spl\_TNL18428, du témoin 96D31.75.GUS, et des plantes non transformées de combinaison allélique R5R11 et S5R11. Les résultats, évalués par le test non paramétrique de Mann et Whitney, ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les événements transformés avec le gène Spl\_TNL18428 et le témoin 96D31.75.GUS. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats obtenus lors du test *in vitro*, dans lequel nous avons trouvé des différences significatives pour les cinq événements de transformation indépendants.

Les plantes transgéniques régénérées après transformation du génotype 96D31.69, possédant les allèles de sensibilité aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>*, ont également été évaluées par un test de résistance en pot. Les résultats de ce test sont décrits dans le tableau 3.3 b). Les nombres de kystes retrouvés dans les racines des six événements indépendants ont



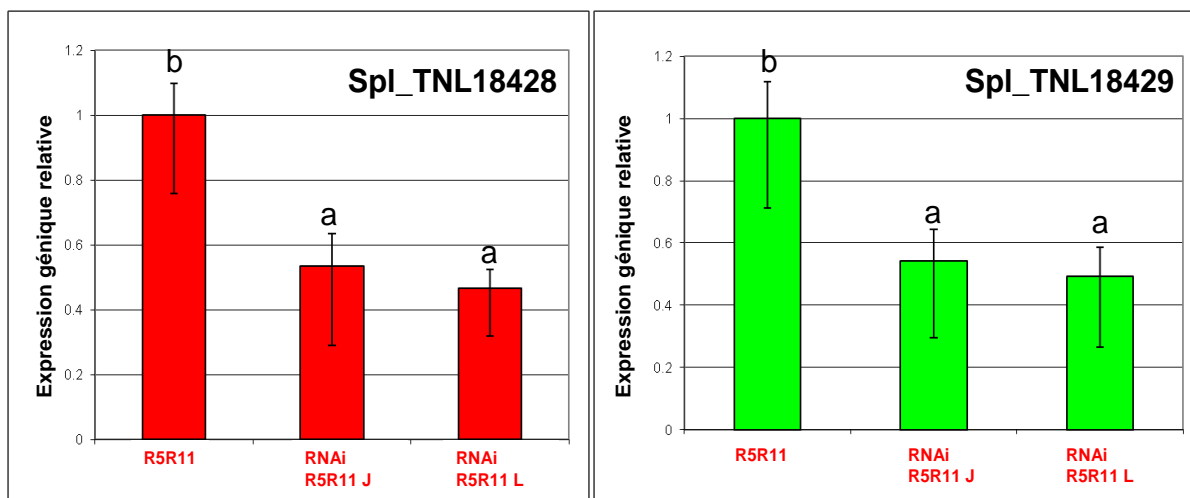
été comparés aux témoins par un test non paramétrique de Mann et Whitney. Aucune différence significative n'a été détectée par rapport aux témoins 96D31.69.GFP. Comme pour les plantes transformées issus du génotype 96D31.75, ces résultats sont en contradiction avec les résultats obtenus lors du test *in vitro*.

### **3.1.2. Analyse fonctionnelle par extinction de l'expression de gènes candidats TIR-NBS-LRR dans des plantes résistantes**

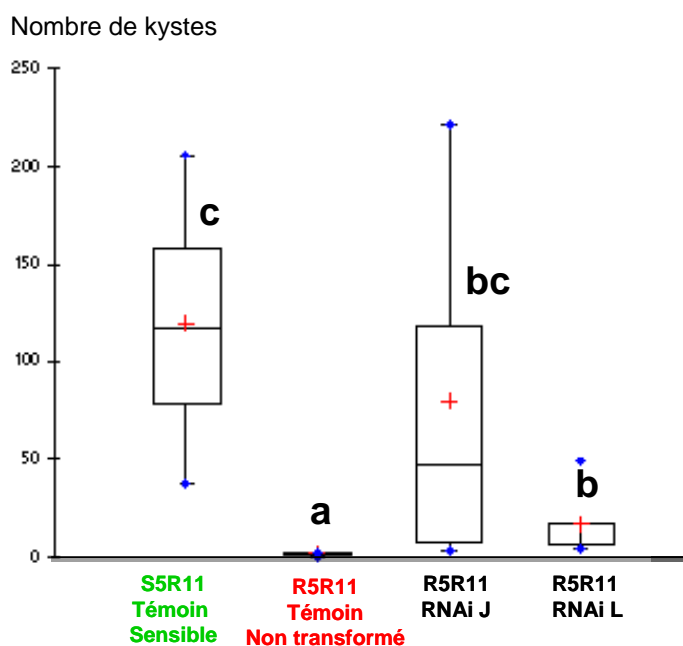
Avant mon arrivée en thèse, des expériences d'extinction de gène par ARNi ont été conduites, visant à diminuer l'expression du gène candidat TIR-NBS-LRR localisé au locus *GpaV<sub>spl</sub>*. Ces expériences, basées sur les séquences disponibles en 2008 avaient permis d'introduire une construction ARNi ciblant le domaine LRR du gène dans une plante (96D31.46) comportant les allèles de résistance aux deux QTL (R5R11). Dans les deux événements de transformation étudiés (96D31.46.J et 96D31.46.L), la réaction de nécrose observée autour des nématodes, dans les plantes possédant les allèles de résistance aux deux QTL, était abolie lors d'un test de résistance *in vitro* (Figure 3.3, A. Vernet, 2008).

Suite à l'obtention de la séquence des deux gènes TIR-NBS-LRR localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* chez *S. sparsipilum*, nous avons mis en évidence que ces deux gènes présentaient un fort pourcentage d'identité nucléotidique (tableau 4.1, chapitre 4) et que les deux gènes pouvaient être la cible de la construction ARNi (Figure 3.4). Nous avons montré par RT-qPCR que l'expression des gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* était diminuée d'environ 50 % (divisé par 2,08 pour le gène *Spl\_TNL18428* et par 1,79 pour le gène *Spl\_TNL18429*) (Figure 3.5). L'effet de la diminution de l'expression des gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*, sur la résistance des plantes 96D31.46.J et 96D31.46.L, a été évalué par un test en pot au cours de ma thèse et dans la même expérimentation que celle décrite au chapitre 3.1.1.4. La plante témoin utilisée était le clone 96D31.46 non transformé.

Les nombres de kystes néoformés (Figure 3.6), récoltés sur les deux événements de transformation 96D31.46.J et 96D31.46.L ont été comparés à ceux obtenus sur le témoin non transformé par un test non paramétrique de Mann et Whitney. Le test montre des différences significatives entre chaque transformant et le témoin non transformé (96D31.46.J,  $p = 0.014$ ; 96D31.75.E,  $p = 0,015$ ). En effet, dans les plantes résistantes pour lesquelles l'expression des gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* a été diminuée par ARNi, le niveau de sensibilité est fortement augmenté. Alors que le nombre maximum de kystes retrouvés sur chacune des



**Figure 3.5 :** Niveaux d'expression relative des gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*, normalisés avec les gènes de référence RPN7, UBP22, MST2 et OXA1 (Castro-Quezada et al. 2013) dans les plantes RNAi par rapport au témoin non transformé (R5R11). Les barres d'erreur indiquent l'écart type moyenne de l'échantillon. La significativité des différences entre les niveaux d'expression a été déterminée avec le logiciel REST (Pfaffl et al. 2002).



**Figure 3.6** Résultats du test de résistance en pot sur les plantes transformées par la construction ARNi ciblant le domaine LRR du gène TIR-NBS-LRR localisé au locus *GpaV<sub>spl</sub>*. Le test de résistance a été fait sur quatre plantes par échantillon. La significativité des différences entre les transformants et le témoin non transformés R5R11 a été évaluée par le test non paramétrique de Mann et Whitney. Le génotype S5R11 représente la combinaison de QTL attendue si l'expression du (des) gène(s) responsable(s) de la résistance conférée par le QTL *GpaV<sub>spl</sub>* était totalement abolie. Le trait noir au milieu de la boîte montre la position de la médiane. Les premier et troisième quartiles se situent à la hauteur du dessous et du dessus de la boîte respectivement. La croix rouge montre la position de la moyenne. Les barres horizontales aux extrémités représentent les valeurs extrêmes. Les lettres en minuscule indiquent les différences significatives.



quatre répétitions du génotype témoin était de trois, ce nombre maximum atteint 221 pour le transformant 96D.31.46.J et 49 pour le transformant 96D.31.46.L. Ceci démontre clairement qu'un gène ayant une séquence homologue à la séquence utilisée dans la construction ARNi est impliqué dans la résistance à *G. pallida*.

### **3.2. Analyse fonctionnelle du gène *Spl\_mTERF18430* localisé au QTL *GpaV<sub>spl</sub>***

Le gène *Spl\_mTERF18430* a été amplifié par PCR longue distance chez *spl329.18*, avec 1,6 kb de séquences promotrices et 1,7 kb de séquence terminatrices. Il a été cloné dans le plasmide binaire pBIN19. Le vecteur recombiné a été introduit dans la souche d'*A. tumefaciens* GV2260, de type C58, et la transformation génétique a été réalisée comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Le clone 96D31.69, possédant les allèles de sensibilité aux deux QTLs *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>* (S5S11), a été transformé avec le gène *Spl\_mTERF18430* sous le contrôle de son propre promoteur et 15 transformants ont été régénérés sur un milieu contenant de la kanamycine. L'insertion du transgène dans les différents événements de transformation a été vérifiée par PCR.

La résistance à *G. pallida* de plantes transformées avec le gène *Spl\_mTERF18430* a été évaluée par un test en pot. Trois événements de transformation indépendants ont été testés. Ces événements de transformation indépendants ont été nommés 96D31.69.A\_mTERF, 96D31.69.B\_mTERF et 96D31.69.C\_mTERF. Le génotype 96D31.69 transformé avec le gène GFP a été utilisé comme témoin (nommé 96D31.69.GFP\_A et 96D31.69.GFP\_B).

Le nombre de kystes trouvés dans les racines des trois événements de transformation ont été comparés à ceux retrouvés sur les génotypes témoins 96D31.69.GFP. Le tableau 3.4 présente un comparatif des nombres de kystes collectés pour les trois transformants, ainsi que pour les témoins utilisés. Selon le test non paramétrique de Mann et Whitney, les trois événements de transformation ne sont pas significativement différents des témoins.

### **3.3. Conclusions**

La manipulation de nématode à kystes à l'UR GAFL d'Avignon a démarrée peu de temps avant mon arrivée. Auparavant, toutes les expériences impliquant la manipulation de nématodes à kystes de la pomme de terre étaient réalisées à l'UMR BiO3P du Rheu, seule

**Tableau 3.4 :** Résultats du test de résistance en pot sur les plantes transformées avec le gène Spl\_mTERF18430 sous le contrôle de son propre promoteur. Les kystes néoformés ont été dénombrés après une saison de culture sur 4 plantes par échantillon.

Les événements indépendants de transformation ont été notés 96D31.69.A\_mTERF à 96D31.69.C\_mTERF. Les génotypes 96D31.69 et 96D31.69\_GFP ont été utilisés comme témoins non transformé ou transformé avec un gène rapporteur. Le génotype 96D31.46 représente la combinaison de QTL attendue (R5R11) si le gène Spl\_mTERF18430 est responsable de la totalité de la résistance conférée par le QTL *GpaV<sub>spl</sub>*.

Clones	Nb kystes				$\Sigma/n$ kystes	Ecart-type
96D31.69.A_mTERF	39	54	189	429	178	180,6
96D31.69.B_mTERF	26	116	139	437	180	178,5
96D31.69.C_mTERF	186	261	355	396	300	94,4
Témoin 96D31.69.GFP_A	217	348	387	484	359	110,6
Témoin 96D31.69.GFP_B	4	19	183	233	110	115,4
96D.31.69 (R5R11)	274	374	614	875	534	268,3
96D.31.46 (R5R11)	0	1	2	3	2	1,3

unité INRA habilitée jusqu'alors pour la manipulation de ces parasites de quarantaine. L'habilitation récente de l'UR GAFL pour la manipulation de *G. pallida* est limitée à des expériences *in vitro*. Il était donc nécessaire, au démarrage de ma thèse, de mettre au point une méthode d'inoculation de racine de pomme de terre par *G. pallida*, permettant de distinguer des plantes avec différents niveaux de résistance et de sensibilité.

Les conditions de culture post-inoculation, et en particulier les conditions de température, ont eu un effet très significatif sur le développement des nématodes. Bien que des tests de résistance en boîte de Pétri soient couramment réalisés à 20-22°C à l'UMR BiO3P du Rheu, ces tests sont réalisés sur racines issues de tubercules, à l'obscurité. Comme nous avons utilisé des racines issues de boutures *in vitro*, nous avons été contraints de placer les boutures à la lumière afin que les racines, et donc les syncytiums, puissent être alimentés en nutriments grâce à la photosynthèse. Cependant, l'élévation de la température dans les boîtes de Pétri, due à l'effet de serre généré par la lumière, a été néfaste pour le développement des nématodes dans la chambre de culture réglée à 22°C : la majorité d'entre eux n'ont pas pu se développer en femelle dans les plantes sensibles. En revanche, dans le phytotron réglé à 17°C, nous avons pu distinguer les plantes en fonction de leurs combinaisons alléliques au QTLs. Seule la différence entre plantes R5R11 et R5S11 n'est pas significative. Cette différence entre les fréquences de nématodes atteignant le stade "femelle" dans les plantes R5R11 et R5S11 n'était pas non plus significative dans les expérimentations menées au Rheu sur des racines issues de tubercules (Caromel et al. 2005). Suite à cette expérimentation, nous avons estimé qu'en réalisant le test de résistance dans le phytotron réglé à 17°C, les conditions étaient réunies pour différencier des clones de pomme de terre porteurs de l'allèle de résistance ou de l'allèle de sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>*, et que nous pouvions utiliser ce test de résistance pour la caractérisation des plantes transformées avec les gènes candidats pour le locus *GpaV<sub>spl</sub>*.

Les gènes de la famille TIR-NBS-LRR sont des gènes de résistance classiques, trouvés dans plusieurs espèces cultivées, y compris les Solanacées. Au démarrage de ma thèse, le gène TIR-NBS-LRR cartographié au locus *GpaV<sub>spl</sub>*, était le gène candidat le plus évident pour expliquer la résistance à *G. pallida* conférée par ce locus et il avait été décidé d'étudier son implication dans la résistance à *G. pallida* par deux stratégies : l'extinction génique à partir d'une plante résistante et la complémentation de plantes sensibles au locus *GpaV<sub>spl</sub>* avec l'allèle lié à la résistance. A cette date, nous n'avions pas encore déterminé que le locus

*GpaV<sub>spl</sub>* était dupliqué et que deux gènes TIR-NBS-LRR étaient présents dans l'intervalle identifié par cartographie.

L'allèle du gène Spl\_TNL18428 lié à la résistance a été cloné chez spl329.18 pour analyser fonctionnellement son implication dans la résistance à *G. pallida*. Un génotype possédant l'allèle de sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de résistance au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* (96D31.75, S5R11) et un deuxième génotype possédant l'allèle de sensibilité aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>* (96D31.69, S5S11) ont été transformés avec ce gène. La résistance à *G. pallida* a été évaluée sur plusieurs événements de transformation par un test *in vitro* et par un test en pot. Cependant les résultats obtenus lors des deux tests sont contradictoires. Les données obtenues après les tests *in vitro* révèlent l'installation d'une résistance significative chez les plantes transformées par comparaison aux plantes témoins alors qu'aucune différence n'a été observée lors du test en pot. Les résultats du test en pot se sont révélés très hétérogènes d'une répétition à l'autre. Pour aucun transformant, nous n'avons pu mettre en évidence des nombres de kystes néoformés significativement différents de ceux retrouvés dans les témoins transformés avec un gène rapporteur. Ces résultats pourraient s'expliquer si plusieurs gènes étaient nécessaires pour obtenir la totalité de la résistance conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>*.

Avant mon arrivée en thèse, des expériences d'extinction de gène par ARNi avaient été initiées, visant à diminuer l'expression du gène candidat TIR-NBS-LRR. Pendant ma thèse et suite à un test de résistance en pot sur une saison de culture, nous avons constaté, que le nombre de nématodes capables de se développer en femelle et de former un kyste était significativement plus élevé dans les plantes transformées avec la construction ARNi que dans la même plante non transformée. Ce résultat d'abolition, même partielle, de la résistance démontre qu'un gène ayant une séquence homologue à la séquence utilisée dans la construction ARNi est impliqué dans la résistance à *G. pallida*.

Le clone 96D31.69 (S5S11) a été transformé avec le gène Spl\_mTERF18430, placé sous le contrôle de son propre promoteur. La résistance à *G. pallida* des plantes transformées a été évaluée par un test en pot. Les résultats montrent que les plantes transformées avec le gène Spl\_mTERF18430 ne sont pas significativement différentes du témoin et ne permettent pas de conclure à l'implication du gène Spl\_mTERF18430 dans la résistance à *G. pallida*.

## Chapitre 4 : Régulation des gènes candidats Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>*

Un des objectifs de ma thèse est d'étudier la régulation de gènes candidats au locus *GpaV<sub>spl</sub>*. Nous nous sommes focalisés sur les deux gènes TIR-NBS-LRR annotés à ce locus. Pour étudier la régulation de ces gènes, nous avons choisi deux approches : l'étude du niveau d'expression des deux gènes candidats Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 par RT-qPCR et la localisation tissulaire du gène rapporteur GFP fusionné au promoteur du gène candidat Spl\_TNL18428.

### 4.1 Comparaison des séquences des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>*

En 2011, les données du séquençage du génome de la pomme de terre nous ont permis de voir que le locus comprenant les gènes candidats TIR-NBS-LRR (TNL) et mTERF était en réalité dupliqué chez *S. phureja*. Dans le cadre d'un projet INRA-Transfert, notre équipe a mis en évidence que le locus était également dupliqué chez *S. sparsipilum*. Nous avons comparé les séquences codantes des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429, aux niveaux nucléotidique et protéique.

La comparaison nucléotidique des deux séquences a été faite à l'aide du logiciel Lalign en utilisant les paramètres par défaut. ([http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)). La comparaison a été faite pour l'ensemble de la séquence codante et pour chaque domaine : TIR (Exon 1), NBS-ARC (Exon 2) et LRR (Exon 3 plus Exon 4). Les pourcentages d'identité nucléotidique sont indiqués dans le tableau 4.1.

La comparaison des séquences protéiques a été faite avec le logiciel FASTA : protéines : protéine, avec les paramètres par défaut à l'exception de la pénalité d'ouverture de gaps qui a été ajustée à -5, afin que l'alignement tienne compte de la répétition de sérines présent (es) dans le début du gène ([http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_www.cgi?rm=compare](http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=compare)). Comme pour la comparaison entre nucléotides, l'alignement a été fait pour l'ensemble de la séquence codante et pour chaque domaine. De plus, nous avons comparé les séquences de Spl\_TNL18428 et de

**Tableau 4.1 :** Comparaison des séquences nucléotidiques des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_Spl\_TNL18429

<b>Exons (Domaines)</b>	<b>Pourcentage d'identité entre Spl_TNL18428 et Spl_TNL184289</b>
Séquence complète	93,4 %
Exon 1 (TIR)	98 %
Exon 2 (NBS-ARC)	97,4%
Exon 3 et 4 (LRR)	89,7%

**Tableau 4.2 :** Comparaison des séquences protéiques des gènes Spl\_TNL18428, Spl\_TNL18429 et *Bs4*

<b>Exons (Domaines)</b>	<b>Pourcentage d'identité entre Spl_TNL18428 et Spl_TNL184289</b>		<b>Pourcentage d'identité entre Spl_TNL18428 et <i>Bs4</i></b>		<b>Pourcentage d'identité entre Spl_TNL18429 et <i>Bs4</i></b>	
	<b>Identité</b>	<b>Similarité</b>	<b>Identité</b>	<b>Similarité</b>	<b>Identité</b>	<b>Similarité</b>
Séquence complète	87,9 %	93,4 %	80,1 %	90,4 %	80,1 %	90,7 %
Exon 1 (TIR)	97,6 %	98,8 %	90,6 %	97,1 %	90,1 %	97,1 %
Exon 2 (NBS-ARC)	94,2 %	96,7 %	84,3 %	93,7 %	86,8 %	95,6 %
Exon 3 et 4 (LRR)	81,6 %	90,1 %	74,9 %	86,9 %	73,5 %	86,1 %

Spl\_TNL18429 avec la séquence du gène *Bs4*, l'orthologue des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 chez la tomate (Tableau 4.2).

La comparaison des séquences nous a permis de définir des amorces spécifiques, qui ont été utilisées pour quantifier l'expression des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429, après inoculation des racines de pomme de terre par *G. pallida* par comparaison à des plantes non inoculées.

#### 4.1.1. Comparaison des séquences

Le gène Spl\_TNL18428 comprend 3387 pb de séquences codantes et le gène Spl\_TNL18429 en comprend 3444 pb (voir annexes 4 et 5). La comparaison des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 au niveau des nucléotides a permis déterminer que les deux gènes étaient fortement homologues. Ils partagent 93.4% d'identité nucléotidique. Les variations nucléotidiques les plus significatives entre les deux gènes sont situées dans le domaine LRR (89.7% d'identité). Pour les domaines TIR et NB-ARC, les pourcentages d'identité nucléotidiques sont respectivement de 98% et 97.4% (Tableau 4.1).

Au niveau des acides aminés nous avons comparé l'identité et similarité entre les gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 et entre les gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 et le gène *Bs4* de la tomate (voir annexes 6 et 7). L'identité entre Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 est de 87.9% et la similarité de 93.4%. Les pourcentages d'identité et de similarité entre Spl\_TNL18428 ou Spl\_TNL18429 et *Bs4* sont inférieurs (80,1% d'identité et 90,4% de similarité pour Spl\_TNL18428 et 80,1% d'identité et 90,7% de similarité pour Spl\_TNL18429). Ces résultats sont récapitulés dans le tableau 4.2.

Si nous comparons les différences protéiques pour chaque domaine, nous trouvons également que les différences les plus importantes se trouvent dans le domaine LRR. Nous avons trouvé 81.6% d'identité et 90.1% de similarité entre les domaines LRR des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429. Les pourcentages d'identité et de similarité entre les domaines LRR de Spl\_TNL18428 et *Bs4* sont de 74.9% et 86.9%. Les pourcentages d'identité et de similarité entre les domaines LRR de Spl\_TNL18429 et *Bs4* sont de 73,5% et 86,1%. Pour les trois domaines, les différences sont plus importantes entre *Bs4* et l'un ou l'autre des deux gènes Spl\_TNL, qu'entre les deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429.





### **4.1.2. Définition d'amorces spécifiques de chaque TNL**

Afin de mesurer spécifiquement le niveau d'expression de chacun des gènes Spl\_TNL18428 ou Spl\_TNL18429, il était nécessaire de définir des couples d'amorces permettant d'amplifier un gène sans amplifier l'autre. Les séquences nucléotidiques des domaines LRR ont été alignées avec le logiciel Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) et des couples d'amorces ont été définis dans des régions divergentes. Ces couples d'amorces ont été testés en PCR sur le gène Spl\_TNL18428 cloné dans un vecteur binaire, le gène Spl\_TNL18429 cloné dans un vecteur binaire et de l'ADN génomique du génotype de pomme de terre Caspar H3, parent sensible de la population 96D31 dont un allèle est présent chez tous les individus de cette descendance. Les amorces Q216 ont permis d'amplifier spécifiquement le gène Spl\_TNL18428 et les amorces Q212 ont permis d'amplifier spécifiquement le gène Spl\_TNL18429 (Figure 4.1).

## **4.2. Mesure du niveau d'expression des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>***

### **4.2.1. Des gènes de référence sont nécessaires pour normaliser l'expression des gènes candidats**

L'analyse de l'expression génique est devenue une approche essentielle pour la compréhension de nombreux processus en biologie végétale. L'une des techniques les plus utilisées actuellement est la RT-qPCR en raison de sa sensibilité, de sa spécificité élevée et de sa reproductibilité. Cependant, cette technique nécessite l'utilisation de gènes de référence comme contrôles internes. Les différences d'expression d'un gène candidat dans différentes conditions d'étude ne peut être validée que si les gènes de références choisis s'expriment de façon stable quelque soit les conditions étudiées. Dans le cas de la pomme de terre, le nématode à kyste *G. pallida* induit des changements dans l'expression des gènes, lors de l'invasion des racines. Cependant, aucun gène de référence n'a été décrit comme stable chez la pomme de terre, dans les interactions plantes-nématodes (compatible ou incompatible). C'est pour cela que nous avons identifié et validé des gènes de référence, pour normaliser les différences entre les niveaux de transcription de douze génotypes correspondant aux quatre combinaisons alléliques (R5R11, R5S11, S5R11 et S5S11), 6, 48 et 96 heures après inoculation, par comparaison à des témoins non inoculés.

Article paru dans Plant Molecular Biology Reporter en 2013

D.O.I: 10.1007/s11105-013-0566-3

<http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/11105>

# Identification of reference genes for normalizing RNA expression in potato roots infected with cyst nematodes

## Authors

Patricio Castro-Quezada, Jawad Aarouf, Michel Claverie, Bruno Favery, Didier Mugniéry, Véronique Lefebvre and Bernard Caromel

## Abstract

Potato cyst nematodes induce changes in plant host gene expression following root invasion. For accurate comparison of gene expression by reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR), internal reference genes are necessary for transcript normalization. Very few experimental data on suitable reference genes are available for interactions between plant and root pathogens. In this study, we tested eight potential candidate reference genes, for normalizing levels of potato gene transcripts by RT-qPCR, after inoculation by nematodes. Ranking of candidate reference genes was performed using RefFinder WEB-based software. Four reference genes, RPN7 (26S proteasome regulatory subunit), UBP22 (Ubiquitin-specific protease 22), OXA1 (OXA1 protein) and MST2 (mercaptopyruvate sulfurtransferase), were stably expressed in roots of susceptible or resistant potato plants, infected or uninfected by *Globodera pallida*. A normalization factor based on data from these four genes, highly homologous between potato and tomato, was used to normalize the expression of a chitinase gene, which was induced by nematodes in roots of potatoes carrying the resistance allele at a low effect QTL, *GpaXI<sub>spl</sub>*.

**Keywords:** RT-qPCR; transcript normalization; compatible-incompatible interactions; *Globodera pallida*; *Solanum*; chitinase

P. Castro-Quezada, M. Claverie, V. Lefebvre and B. Caromel  
INRA, UR1052 GAFL Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint  
Maurice, Allée des Chênes, CS 60094, F-84143 Montfavet Cedex, France

J. Aarouf  
UAPV, Laboratoire de Physiologie des Fruits et des Légumes, Pôle Agrosiences  
BP 21239, F-84916 Avignon cedex 9, France.

B. Favery  
INRA, UMR INRA 1355 – UNS - CNRS 7254 Institut Sophia-Agrobiotech, 400 route des  
Chappes,  
F-06903 Sophia Antipolis, France

D. Mugniéry  
INRA, UMR 1349 IGEPP INRA/Agrocampus Ouest/Université Rennes1,  
F-35653 Le Rheu, France

Corresponding author: B. Caromel  
Fax number: 33 (0)4 32 72 27 02  
E-mail address: [Bernard.Caromel@avignon.inra.fr](mailto:Bernard.Caromel@avignon.inra.fr)

## Introduction

Gene expression analysis has become an essential method for understanding many processes in plant biology. Reverse transcription quantitative real time PCR (RT-qPCR) is the main technique used to investigate gene expression changes due to its high sensitivity, specificity and reproducibility (Bustin and Nolan 2004; Vandesompele et al. 2002). To accurately measure the variation of expression levels between samples for a gene of interest, the most accepted approach is to normalize its expression level to reference genes used as internal controls. A good reference gene should be stably expressed between the different conditions investigated. The reference gene is used to correct for the different amounts of starting RNA and for the variable efficiency of the reverse transcription between samples. Genes involved in basic cellular processes, such as those encoding ubiquitins, actins, tubulins, GAPDH and 18S rRNA have been used as reference genes (Guo et al. 2012, Gupta et al. 2011, Inigo et al. 2012, Stolf-Moreira et al. 2011, Yang et al. 2011). However, using putative "housekeeping genes" as references is no longer considered as good practice (Gutierrez et al. 2008) as it has been recently demonstrated that genes from multigenic families i.e. actins have specific spatio-temporal expression and that no genes are universally stable (Hruz et al. 2011). Statistical algorithms and associated programs like NormFinder, BestKeeper, geNorm or comparative delta-Cq method have been developed to select the most suitable reference gene(s) for transcript normalization from a panel of candidate genes putatively stably expressed (Andersen et al. 2004; Pfaffl et al. 2004; Vandesompele et al. 2002, Silver et al. 2006). Depending on the software used, the ranking of candidate reference genes can be slightly different (Goulao et al. 2012, Qi et al. 2010, Rivera-Vega et al. 2012). Methods and tools have recently been developed to integrate the rankings provided by different software (Goulao et al 2012, Xie et al. 2012).

We are interested in plant-nematode compatible and incompatible interactions. In potato, oligogenic resistances to the cyst nematode *Globodera pallida* have been introgressed from wild species into the cultivated species *Solanum tuberosum*. The resistance originating from the wild species *S. sparsipilum* is conferred by two quantitative trait loci (QTL): one major effect QTL named *GpaV<sub>spl</sub>* and one low effect QTL named *GpaXI<sub>spl</sub>*. Depending on the combination of alleles at both QTLs, the resistance reaction of the plant varies between a strong necrotic reaction to a shift of the sex-ratio of nematode populations (Caromel et al. 2005). The resistance takes place approximately two days after the penetration of the nematode in the root, once the feeding cell, named syncytium, is initiated (Caromel et al.

2005; Jolivet et al. 2007; Mugniéry et al. 2001). Several genes coding for pathogenesis-related (PR) proteins are induced in response to pathogen infections (Grover 2012, Jolivet et al. 2007). Among PR proteins, several chitinase genes have been demonstrated to be induced upon nematode infection (Rahimi et al. 1998).

Nicot et al. (2005) described reference genes for normalization in RT-qPCR experiments in potato. They investigated seven putative reference genes, particularly in the compatible interaction between the oomycete *Phytophthora infestans* and potatoes, and highlighted that EF1 $\alpha$  (elongation factor 1 $\alpha$ ) and 18S rRNA, followed by  $\beta$ -tubulin, were the most stable genes in the compatible interaction between *P. infestans* and potato leaves. Nevertheless, the stability of those genes was not tested, either in roots, or in an incompatible plant-pathogen interaction. Furthermore, EF1 $\alpha$  was reported as being differentially expressed in a few plant-nematode interactions (Hofmann and Grundler, 2007, Vaghchhipawala et al. 2001). In addition, the relevancy of using 18S rRNA as reference gene in RT-qPCR experiment has been questioned, because of their high abundance relative to the genes of interest (Vandesompele et al. 2002).

Analysis of microarray data usually allows a set of candidate reference genes to be chosen. Several transcriptomic analyses of plant-nematode interactions have been published (for review see Escobar et al. 2011), but genes whose expression is stably expressed are rarely reported. Jammes et al. (2005) published nine genes stably expressed in the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*.) and *Arabidopsis thaliana*. In the present work, we used this latter study as starting point to evaluate the stability of candidate reference genes in compatible and incompatible potato-nematode interactions. We added the  $\beta$ -tubulin gene to compare our results with those obtained by Nicot et al. (2005). The best ranked reference genes were used for normalizing the expression level of a chitinase gene, which was regulated by a low effect resistance QTL upon nematode infection.

## **Materials and Methods**

### **Biological material and experimental design**

Potato clones, issued from the QTL mapping progeny described in Caromel et al. (2005), were chosen according to their allelic combinations at both QTLs determining resistance to *G. pallida*. For each of the four allelic combinations at QTLs, three clones were selected as being identical at QTL positions and as different as possible on the rest of the genome. Thus, a total

number of 12 potato clones were analyzed. For each clone, 30 sprouting tubers were grown in Petri dishes. Two to three emerging roots per tuber, from 15 tubers, were inoculated with juveniles of *G. pallida*, population Chavornay, as described by Mugniéry and Person (1976). Roots from the 15 remaining tubers per clone were used as mock-inoculated controls. Samples consisting of pools of five root sections of 5 mm each around the inoculation point were excised from two tubers per sample (two and three root sections per tuber), at 6 hours post-inoculation (hpi) and 2 or 4 days post-inoculation (dpi). Pools of five root sections of 5 mm each around the mock-inoculated point were sampled similarly from control tubers at each time-point. The experimental design consisted of 72 samples: four allelic combinations at resistance QTLs represented each by three potato clones considered as biological replicates, inoculated or mock-inoculated and sampled during a three-point time-course.

### Sample processing

After sampling, pools of root sections were immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. RNAs from each sample were extracted with the RNeasy plant mini kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. RNA concentration was measured with the Quant-iT RiboGreen kit (Invitrogen). RNA integrity was checked following agarose gel electrophoresis of 1 µl of RNA extracts, by evaluating the integrity of the 28S and 18S ribosomal RNA bands and the absence of smears (Supplementary figure S1). The purity of RNA extracts was assessed by absorption ratios, measured with a NardoDrop ND-1000 spectrophotometer. A260/280 ratios were comprised between 1.98 and 2.24 and A260/230 ratios between 2.10 and 2.32, indicating that RNA samples were free of proteins and organic compounds.

Potential contaminating DNA was removed from 1 µg of RNA per sample, by one hour treatment at 40 °C with 1 unit of recombinant Shrimp DNase (USB) in 12.5 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. RNase reaction was stopped by an incubation step of 20 min at 65 °C. To ensure that all contaminating DNA was digested, a PCR reaction with primer MST2 (see below) was performed with 40 ng of total RNA as template. No RNA sample produced PCR amplification, contrary to the DNA positive control, revealing an absence of DNA contamination in RNA samples.

An aliquot of 250 ng of DNase-treated RNA was primed with 2.5 µM of oligo-d(T)<sub>18</sub>VN by a heating step at 65°C for 5 minutes followed by an incubation step on ice for

**Table 1** Candidate reference genes used for gene expression normalization in potato/*Globodera pallida* interactions. The potato TC number was given by the Gene Index Project (TGI) and the Arabidopsis locus name by the TAIR database. PGSC loci were identified in the PGSC potato genome database.

Gene symbol	TGI Potato TC number	Best match PGSC loci	Arabidopsis ortholog locus	Arabidopsis locus description	Biological process
OXA1	TC204983	PGSC0003DMG400005839	At5g62050	Inner membrane protein	Protein complex assembly
UBP22	TC212444	* chr07 2589188-2590066	At5g10790	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
ATPase	TC201915	PGSC0003DMG400016959	At4g09650	ATP synthase delta chain	Plasma membrane ATP synthesis coupled proton transport
OVA6	TC205011	PGSC0003DMG400027526	At5g52520	Prolyl-tRNA synthetase, putative	Prolyl-tRNA aminoacylation
RPN7	TC203637	PGSC0003DMG40202421	At4g24820.2	26S proteasome regulatory subunit, putative	Protein synthesis
KAS1	TC200484	PGSC0003DMG400030158	At5g46290	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase I	Fatty acid biosynthetic process
MST2	TC206257	PGSC0003DMG400022232	At1g16460	Mercaptopyruvate sulfurtransferase-like protein	Unclassified proteins
TUB	EU935742	PGSC0003DMG400009938	At1g75780.1	Beta tubulin gene	Microtubule-based movement

\* No PGSC locus was annotated for UBP22, but one single genome location on *S. phureja* pseudomolecules was identified with 98 % identity on the whole sequence.



one minute. Primed RNA was reverse-transcribed in 20  $\mu$ l, using one unit of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) in the manufacturer's recommended buffer, in the presence of one unit of RNasin (Promega), for two hours at 50 °C. The reaction was inactivated by heating at 70°C for 15 minutes. From each reverse-transcribed RNA sample, 5  $\mu$ l were removed and pooled to prepare a seven point four-fold serial dilution. The remaining 15  $\mu$ l were diluted 10 fold before being subjected to qPCR.

#### Candidate reference gene selection and primer design

Seven candidate reference genes were chosen from Jammes et al (2005). Arabidopsis protein sequences of the seven genes were retrieved from the MIPS database (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/athal/>) and a homology search was made against the potato Tentative Consensus (TC) located in the Gene Index Project database (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), using the TBLASTN algorithm (Altschul et al. 1990). For each gene, the corresponding potato TC with the best hit was selected. A reciprocal homology search (BLASTX) to the Arabidopsis protein database allowed the correspondence between the original candidate gene from Arabidopsis and the selected potato TC to be checked. The reciprocal blast was successful for the seven candidate reference genes (Table 1).

As one of the primers of the primer pair published by Nicot et al. (2005) for  $\beta$ -tubulin (GenBank accession Z33382, formerly 609267) did not match any potato Express Sequence Tag (EST) in GenBank, we retrieved from GenBank three sequences (Z33382, Z33402 and EU935742) corresponding to  $\beta$ -tubulin mRNAs. These sequences were aligned with Muscle algorithm implemented in Mega5 software (<http://www.megasoftware.net/>) and two additional primer pairs were designed in the conserved region (see below).

Correspondences between the eight candidate reference genes and *S. phureja* genome were searched for, using the BLASTN algorithm against the PGSC *S. phureja* DM loci database version 3.4 (<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/blast.html>). BLASTN default parameters were used except that the EXPECT e-value threshold was fixed at  $e^{-100}$ . TCs for which no hit was returned were blasted similarly against the PGSC *S. phureja* DM pseudomolecules version 2.1.11. Sequences of the candidate reference genes were blasted against tomato unigenes using the same parameters (<http://solgenomics.net/>).

Two to three primer pairs were designed per potato TC and  $\beta$ -tubulin sequences, using Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu>) with default parameters, except a melting temperature comprised between 59.5°C and 63.5°C, a maximum difference of 2°C between the T<sub>m</sub> of both primers, a length of 18 to 25 bases; a CG content of 35 to 60 %, and a product length between 70 and 180 base pairs (bp).

Specificity of primer pairs was checked using the BLASTN algorithm with parameters adjusted for short input sequences, against the PGSC *S. phureja* DM loci version 3.4 and against the PGSC *S. phureja* DM pseudomolecules version 2.1.11 at the PGSC WEB-site, against the tomato WGS chromosomes version SL2.40 and against the tomato and the potato unigenes at the Solanaceae Genomic Network (SGN) WEB-site, and against *Solanum* ESTs at the NCBI WEB-site. One primer pair was considered as suitable for qPCR experiments in one species (potato or tomato) if i) it matched one EST or unigene of the species without mismatch on the whole sequence and ii) the two primers of a primer pair matched together one single location in the genome of the considered species (in this latter case, several unigenes for one single location on the genome were considered as the result of alternatively spliced transcripts).

#### Real-time quantitative PCR

qPCR experiments were carried out in 96 well plates (Thermo Scientific) heat-sealed with ThermalSeal RT film (Excel Scientific), in a final volume of 10  $\mu$ l, containing 5  $\mu$ l of SYBR *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) kit (Takara Bio), 0.2  $\mu$ M of each primer and 1  $\mu$ l of cDNA. cDNA added for each sample corresponded approximately to 1.25 ng of reverse-transcribed RNA. Three serial dilutions, covering a range of 12.5 to 0.003 ng of reverse-transcribed RNA, were used to calculate PCR amplification efficiency for each primer pair (see below). A typical qPCR experiment comprised in one single PCR plate: the 72 samples, one serial dilution, and one no-template control (NTC). Reactions were run in a Mx3005P Thermocycler (Agilent Technologies), using the following parameters: 95°C for 20 s, followed by 40 cycles at 95°C for 5 s; 60°C for 20 s; 72°C for 10 s, and finally one cycle at 95°C for 1 min; 60°C for 30 s and 95°C for 30 s to generate dissociation curves. Fluorescence values were acquired at the end of the elongation phases. Dissociation curves and electrophoresis of PCR products on a 2.0 % agarose gel were used to check that one single PCR product was amplified. One single peak on the dissociation curves (Supplementary figure S2) and one single band on

agarose gels indicated that one single PCR product was amplified with each chosen primer pair.

A seven point four-fold dilution series was used to generate standard curves. For each primer pair, the PCR amplification efficiency was calculated from the slope obtained by plotting the raw C<sub>q</sub> values of three serial dilutions against the log of the initial template quantity in the standard wells. PCR efficiencies of primer pairs were calculated using the following equation: PCR Efficiency % =  $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$ . For each candidate reference gene, the primer pair with the best efficiency was retained. The sequences of primers are given in Table 2. Primers of the chitinase gene STMEO91 were described in Vuorinen et al (2010).

#### Data analysis

Two PCR plates were run for each primer pair, corresponding to two technical replicates. One serial dilution was added to each plate to ensure that PCR efficiency was similar for each qPCR run. For each sample, the mean C<sub>q</sub> value was calculated based on C<sub>q</sub> values of both replicates. Individual C<sub>q</sub> values were considered as valid only if the difference between both replicates was less than one.

The stability of each candidate gene expression was analyzed using RefFinder (Xie et al. 2012, <http://www.leonxie.com/referencegene.php>). RefFinder is a user-friendly web-based tool, developed for evaluating the stability of reference genes and ranking them using the most commonly used programs dedicated to this task: geNorm (Vandesompele et al. 2002), NormFinder (Andersen et al. 2004), BestKeeper (Pfaffl et al. 2004), and the comparative delta-C<sub>q</sub> method (Silver et al. 2006). Mean C<sub>q</sub> values were entered to the RefFinder WEB page and based on the ranking obtained with each program, RefFinder calculates an overall final ranking.

In addition to the ranking of a set of reference genes, the geNorm software calculates the optimal number of reference genes required for building an accurate normalization factor. To exploit this ability of the program which was not implemented in RefFinder, raw C<sub>q</sub> values were transformed in relative quantities, taking into account PCR efficiencies, with the highest expression level set to 1 as described in the geNorm manual (2008). Relative quantities were loaded in geNorm software in order to determine the optimal number of

reference genes necessary to measure gene expression in our experiment and to calculate a normalization factor.

The values of the normalization factor were used to normalize of the chitinase gene STMEO91 relative quantities. Standard errors were calculated as described in the geNorm manual (2008) to draw figure 4. Differences in STMEO91 expression were compared by the way of a 10000 pairwise fixed reallocation randomization test, computed by the REST 2009 program. As we were working with a small number of samples in each class, randomization tests have the advantage of being more powerful than non-parametric tests and of making no assumption on distribution (Pfaffl et al. 2002). For the gene of interest STMEO91, and the reference genes RPN7, UBP22, OXA1 and MST2, the PCR efficiencies and the mean quantification cycle (Cq) value obtained for each sample were used as inputs. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Analyses were first done on the three biological replicates per allelic combination at both QTLs. As no significant effect was associated with the allelic phase at the major effect *GpaV<sub>spl</sub>* QTL, samples carrying resistance or susceptibility alleles at the minor effect QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* were gathered whatever their allelic phase at *GpaV<sub>spl</sub>*, giving a total number of six biological replicates for each condition.

## Results and discussion

### Strategy to select candidate reference genes and associated primer pairs

In studying gene regulation in potato-nematode interaction, we were looking for candidate reference genes suitable for normalization in RT-qPCR experiments. Thus, we selected a subset of putatively stably expressed genes from published studies, dedicated to biotic interactions in potato or to plant-nematode interactions. Following a microarray analysis, Jammes et al. (2005) validated nine genes by RT-qPCR, as not being differentially expressed between galls collected on roots infected by root-knot nematodes and uninfected roots of *A. thaliana*. We chose seven of these genes as starting point to select candidate reference genes suitable for expression studies in cyst nematode-potato interactions. We retrieved potato ortholog sequences, following a TBLASTN analysis, from the Gene Index Project database (Table 1). We added  $\beta$ -tubulin to compare our results with those published by Nicot et al. (2005) in the interaction between *P. infestans* and potato leaves.

The genome of a potato-related species, *S. phureja*, has recently been sequenced and loci have been annotated (Xu et al. 2011). To identify the loci corresponding to candidate

**Table 2** Primer sequences and amplicon lengths for eight candidate reference genes and a chitinase gene. Amplification efficiency ( $E$ ) and coefficient of correlation ( $R^2$ ) of primer pairs were calculated with MxPro qPCR software.

<b>Gene symbol</b>		<b>Primer sequence</b>	<b>Amplicon length (bp)</b>	<b><math>E</math> (%)</b>	<b><math>R^2</math></b>
OXA1	Forward	5'-GCGATTCTGAAGCCAAAAC-3'	87	98	0.99
	Reverse	5'-TTGTTGACCTTCAGCCACAG-3'			
UBP22	Forward	5'-CAATGCAGCAACGCCAGA-3'	98	100	0.99
	Reverse	5'-AGCAGCAGTAGCACCACCAC-3'			
ATPase	Forward	5'-GGGAGCGAAAAATGTGAGAA-3'	145	93	0.99
	Reverse	5'-AATTTCAAGCTGTGCAGCAA-3'			
OVA6	Forward	5'-GCTGGTGACGAGGAAGAATC-3'	105	95	0.99
	Reverse	5'-GCCTGTCATCAGGCACTTCT-3'			
RPN7	Forward	5'-TTGGGGTGTCTGAGGATTTTC-3'	123	100	0.99
	Reverse	5'-CATTCTTTGCATCAGGACGA-3'			
KAS1	Forward	5'-GCAACCTTCTGCTTCTGAGG-3'	170	100	0.99
	Reverse	5'-CTGCCTAACCAAGCCTGAAA-3'			
MST2	Forward	5'-AGTGCAGCTCGTGTATGGTG-3'	94	100	0.99
	Reverse	5'-ATCCAGAAGCACGCCATCT-3'			
TUB	Forward	5'-AGTTCACTGAAGCCGAGAGC-3'	173	96	0.99
	Reverse	5'-GGCAGAAATTGAACAAACCAAC-3'			
STMEO91	Forward	5'-ACCGCCCGTAAGAAGGAAAT-3'	70	100	0.99
	Reverse	5'-CTGCACTACCACCATTAGTTTCGT-3'			

reference genes, the sequences of the seven potato TCs and the sequence of the  $\beta$ -tubulin (TUB) accession EU935742 were blasted to the *S. phureja* loci database (Table 1). OXA1, ATPase, OVA6 and RPN7 matched one single locus with more than 97 % identity. MST2 matched one single locus with 92 % identity. KAS1 matched two loci, one with 99.61 % identity and the second one with 88.81 % identity. TUB matched 10 loci in *S. phureja* database, the first one with 99 % identity on the whole sequence and the following one with 80 % identity. Thus, as KAS1 and TUB matched several loci in the potato genome, we were particularly cautious in that the primers designed on these genes matched only the locus with the best hit. UBP22 did not match any locus with the chosen expect threshold of  $e^{-100}$ , but matched with the same threshold, one single location on *S. phureja* chromosome 7 with 98 % identity on the whole sequence, revealing a lack of annotation of this locus.

Two to three primer pairs were designed for each candidate reference gene. For each candidate reference gene, the primer pair with the best efficiency was retained. The efficiencies of the chosen primer pairs ranged between 93 % and 100 % (Table 2). Specificity of primer pairs was checked using a BLASTN analysis as described in M&M. All primer pairs matched one single potato gene without mismatch and were suitable for candidate reference gene selection in potato. Interestingly, primer pairs designed on RPN7, MST2, OXA1, KAS1, OVA6 and TUB also matched one single tomato gene without mismatch, and were then also suitable for candidate reference gene selection in tomato.

#### Selection of reference genes for potato-nematode interaction analysis

Testing all the candidate reference genes on the whole set of samples, in which the expression of a gene of interest will be measured, is the best way to chose a set of reference genes and build an accurate normalization factor dedicated to this experiment (Guenin et al. 2009). To investigate gene regulation determined by resistance QTLs to *G. pallida* originating from *S. sparsipilum* (Caromel et al. 2005), we selected 12 potato clones from the QTL mapping progeny, three clones per allelic combination at both QTLs. Because the resistance phenotype appears shortly after the induction of the syncytium by the nematode (Mugniéry et al. 2001), inoculated and mock-inoculated root fragments were excised at three time points: 6 hpi corresponding to the migratory phase of the nematode toward the central cylinder, 2 dpi corresponding to the induction of the syncytium in roots of both resistant and susceptible clones, and 4 dpi corresponding to the degeneration of the syncytium in roots of clones carrying resistance alleles at both minor and major QTLs. qPCR analyses with the eight

**Table 3** Ranking of eight candidate reference genes in potato-nematode interaction, according to their expression stability values as given by RefFinder, based on geNorm, NormFinder, BestKeeper and comparative Delta Cq methods.

<b>Ranking Order</b>								
<b>Method</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Delta Cq	RPN7	UBP22	OXA1	MST2	KAS1	TUB	OVA6	ATPase
BestKeeper	MST2	RPN7	UBP22	OXA1	ATPase	OVA6	KAS1	TUB
NormFinder	UBP22	RPN7	OXA1	MST2	KAS1	TUB	OVA6	ATPase
geNorm	RPN7   UBP22		OXA1	KAS1	TUB	MST2	OVA6	ATPase
<b>RefFinder recommended comprehensive ranking</b>	<b>RPN7</b>	<b>UBP22</b>	<b>MST2</b>	<b>OXA1</b>	<b>KAS1</b>	<b>TUB</b>	<b>OVA6</b>	<b>ATPase</b>

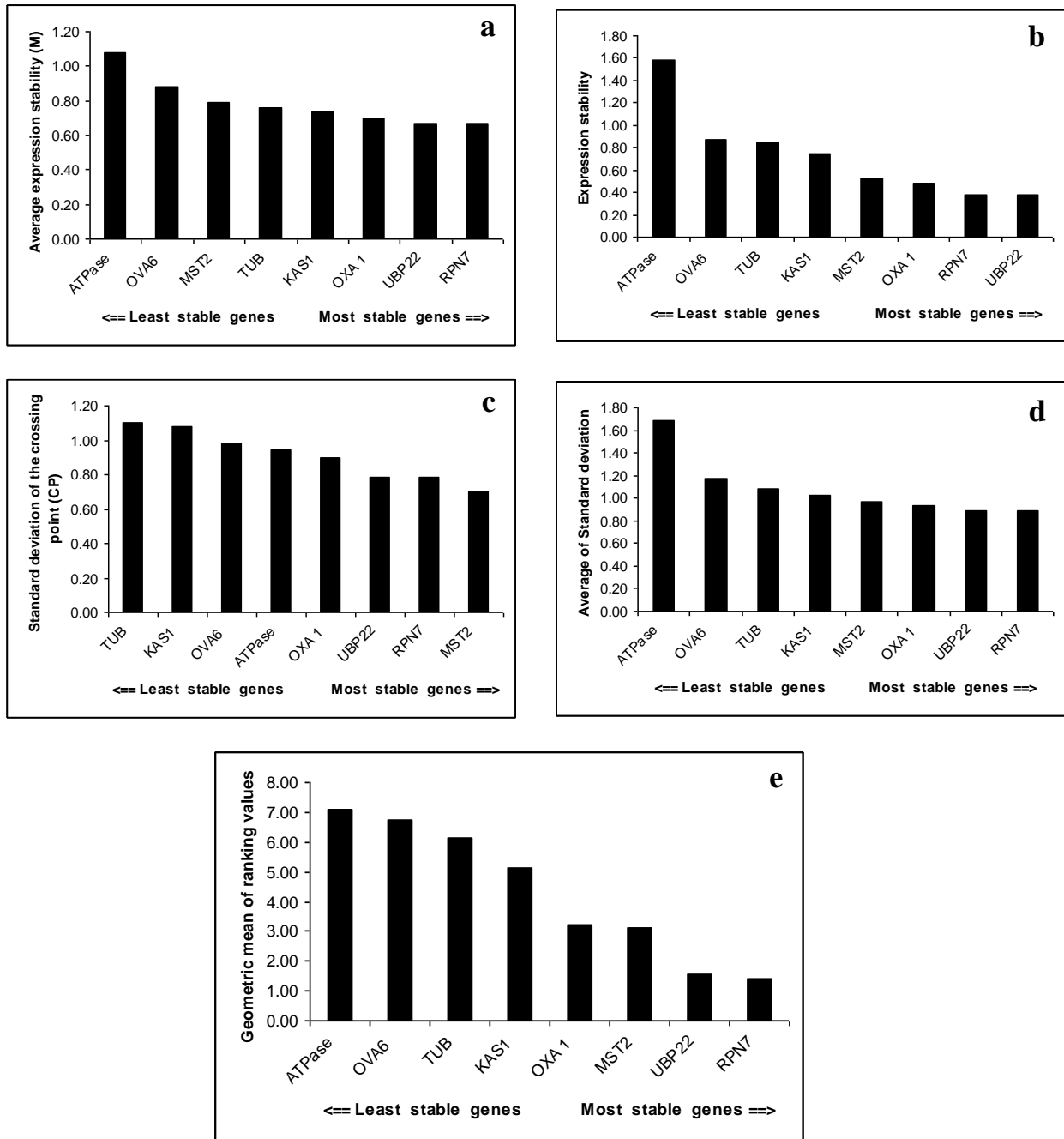
candidate reference genes were then carried out on 72 cDNA samples and were run twice, in two separated PCR plates.

Data were analyzed with a new WEB-based user-friendly software, named RefFinder (Xie et al. 2012, <http://www.leonxie.com/referencegene.php>). The statistical tests developed for candidate reference gene ranking, in the most popular programs geNorm (Vandesompele et al. 2002), NormFinder (Andersen et al. 2004), BestKeeper (Pfaffl et al. 2004) and the comparative delta-Ct method (Silver et al. 2006), are implemented in RefFinder, which produce an overall final ranking. RefFinder was previously used to rank candidate reference genes in papaya (Zhu et al. 2012), in leafy spurge (Chao et al. 2012) and in barley (Ovesna et al. 2012).

The ranking of our candidate reference genes was consistent between the programs, with slight differences (Table 3, Fig 1). RPN7, UBP22, OXA1 and MST2 ranked in the four first with all programs, except geNorm for which MST2 ranked sixth and KAS1 ranked fourth. By contrast, OVA6 and ATPase ranked seventh and eighth with all programs except BestKeeper, and were considered as the least stable transcripts. TUB ranked fifth with geNorm, sixth with delta-Cq method and NormFinder, and eighth with BestKeeper and was then ranked sixth in the comprehensive list calculated by RefFinder. Thus, even if TUB was one of the best ranked reference genes in the potato-*P. infestans* interaction (Nicot et al. 2005), five other genes ranked better in the potato-nematode interaction, and should be preferred for normalization. Nevertheless, the eight genes had high stabilities, with M values, calculating by geNorm, ranging from 0.67 to 1.08, far below the 1.5 maximum threshold recommended by Vandesompele et al. (2002).

The geNorm original software (a VBA Microsoft Excel applet) offers more possibilities than the single ranking implemented in RefFinder. To use these additional possibilities, we converted raw Cq data in relative quantities, taking into account the amplification efficiencies. The ranking of the eight candidate reference genes was the same with the geNorm Excel applet as in the geNorm output returned by RefFinder. We used the geNorm software to calculate the optimal number of reference genes required for building an accurate normalization factor (NF). The program calculates the pairwise variation ( $V_{n/n+1}$ ) between the normalization factors  $NF_n$  and  $NF_{n+1}$  to determine the number of reference genes required for accurate normalization. A V-value below 0.15 was suggested as the limit under which it was unnecessary to add an additional gene for normalization (Vandesompele et al.





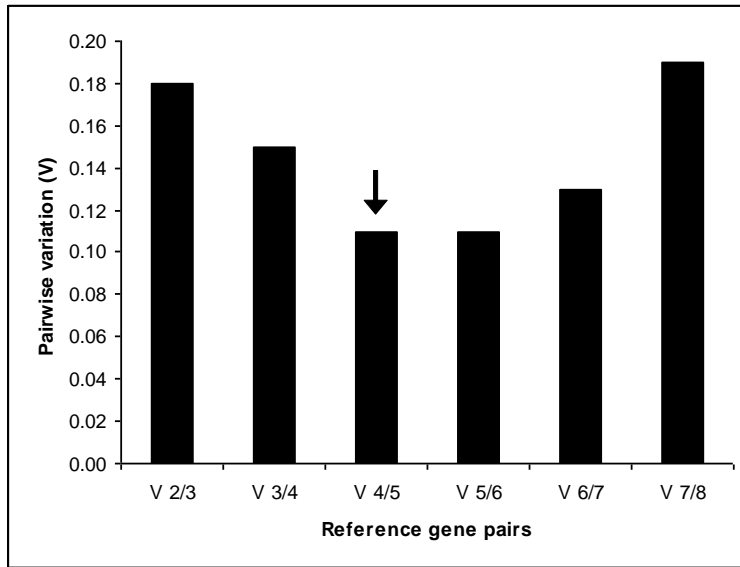
**Fig. 1** Ranking of expression stability values of eight candidate reference genes in roots of potato infected or uninfected by nematodes calculated with RefFinder software, (a) ranking calculated with geNorm program, (b) ranking calculated with NormFinder program, (c) ranking calculated with BestKeeper program, (d) ranking calculated with the comparative Delta Cq method, (e) recommended comprehensive ranking provided by RefFinder. The lowest values indicate more stable transcript expression.

2002). Thus, with a V-value of 0.11, the optimal number of genes for normalization was four or five (Fig. 2). A NF was calculated with geNorm, using data from RPN7, UBP22, OXA1 and MST2. Despite KAS1 ranked four in the list provided by geNorm, we chose to include MST2 instead of KAS1 in the NF because the M value of MST2 (0.79) was closer to that of KAS1 (0.74) and because MST2 ranked in the four first stable genes with all the other programs.

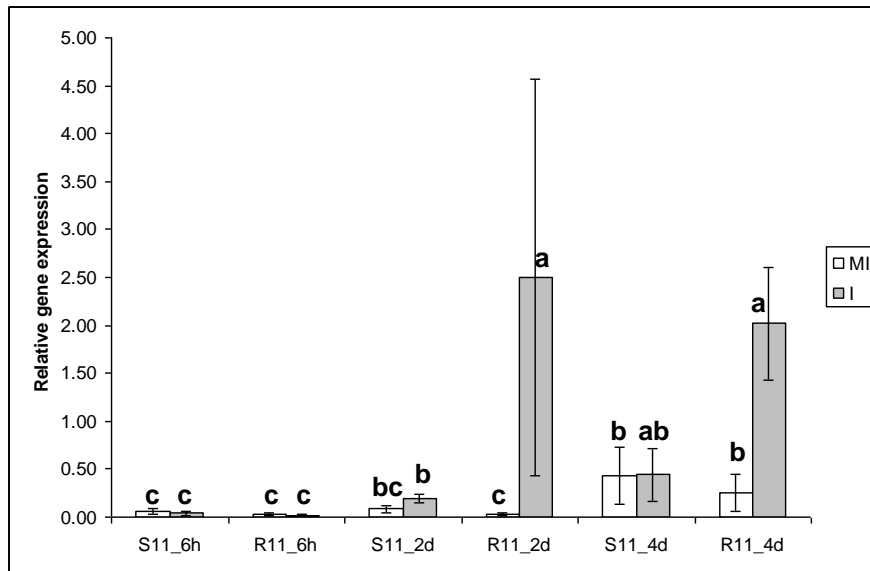
#### Normalization of chitinase gene expression with the best ranked reference genes

To demonstrate the suitability of the selected reference genes in plant-nematode interaction, we used the four genes RPN7, UBP22, OXA1 and MST2 to normalize the expression level of a class II potato chitinase gene. Chitinase proteins have been classified as a subgroup of pathogenesis-related (PR) proteins that are induced when host plant cells are attacked by pathogens (Grover, 2012). Several chitinase genes are induced upon nematode infection (Rahimi et al. 1998). The potato chitinase gene STMEO91 has recently been demonstrated to be highly expressed in an incompatible interaction between potato and potato virus A, using microarray and RT-qPCR experiments (Vuorinen et al. 2010).

We wondered if STMEO91 was differentially regulated following nematode infection in roots of potato plants carrying resistance or susceptibility alleles at QTLs involved in resistance to *G. pallida* (Caromel et al. 2005), and if this change in expression level could be correlated with an allelic combination at resistance QTL. qPCR analyses showed that the expression level of the STMEO91 gene was low in potato roots at 6 hpi in resistant and susceptible plants, whatever the inoculated or mock-inoculated condition (Fig. 3). This observation is not surprising because at this time point, nematodes are in their migratory phase and the resistance do not appears before syncytium initiation (Mugniéry et al. 2001). For each time point, no significant difference between inoculated and mock-inoculated conditions was observed in plants carrying susceptibility alleles at both QTLs, nor in plants carrying the resistance allele at the single major effect *GpaV<sub>spl</sub>* QTL. In plants carrying the resistance allele at the low effect *GpaXI<sub>spl</sub>* QTL, whatever the allele at *GpaV<sub>spl</sub>* QTL, STMEO91 chitinase gene expression significantly increased in inoculated roots, once nematodes initiated their syncytium at 2 and 4 dpi (Fig. 3). At 2dpi the STMEO91 mean expression level was 94 times higher in roots of inoculated plants than in mock-inoculated ones. At 4dpi, the STMEO91 mean expression level slightly increased in inoculated roots of plants carrying the susceptible allele at *GpaXI<sub>spl</sub>* QTL as in mock-inoculated roots. In



**Fig. 2** Determination of the optimal number of reference genes for transcript normalization, using geNorm analysis. Calculation of pairwise variation between two sequential candidate genes ( $V_n/V_{n+1}$ ) was used to evaluate the effect of adding an extra gene in the normalization factor. As the four best ranked reference genes (RPN7, UBP22, MST2 and OXA1) had a V value below 0.15, as recommended by Vandesompele et al. (2002), no extra gene is required. The arrow indicates the optimal number of genes for normalization.



**Fig. 3** Relative expression level of the STME091 chitinase gene, normalized with RPN7, UBP22, MST2 and OXA1 reference genes. The samples were classified according to their allele at the *GpaXI<sub>spl</sub>* QTL (S11 or R11 for susceptibility or resistance allele), in inoculated (I) or mock-inoculated (MI) conditions, during a three-point time-course (6h = 6hpi, 2d = 2dpi and 4d = 4dpi). Error bars are standard error of mean quantities. Different letters represent significant differences between levels of expression, as calculated with the REST software (Pfaffl et al. 2002).

inoculated roots of plants carrying the resistance allele at *GpaXI<sub>spl</sub>* QTL, the STMEO91 mean expression level remained 8 times higher than in mock-inoculated roots.

Vuorinen et al (2010) observed a constitutively higher level of STMEO91 expression in potato plants carrying the resistance allele at a major dominant gene, conferring resistance to virus A (PVA), than in susceptible or partially resistant plants, but they did not observe a significant modification of STMEO91 gene expression after virus inoculation. By contrast, STMEO91 is highly up-regulated, in potato plants carrying *GpaXI<sub>spl</sub>* QTL, following nematode feeding site initiation.

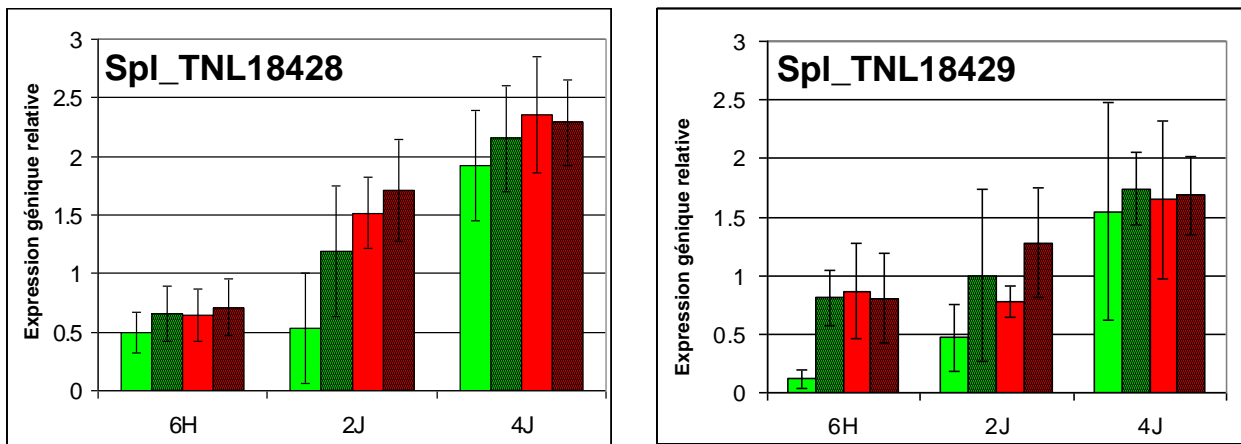
## **Conclusion**

In this study, we reported the identification and the validation of four reference genes as optimal for transcript normalization in both compatible and incompatible interactions between potato roots and potato cyst nematodes. These four genes RPN7, UBP22, OXA1 and MST2 were the most stably expressed genes in our experiment and were used to build a normalization factor. Due to a high level of homology, RPN7, UBP22, OXA1 and MST2 could be used as starting point for candidate reference gene selection in both potato and tomato interactions with additional root pathogens. Moreover, our results suggest a correlation between the up-regulation of the chitinase gene STMEO91 and the allelic phase at the low effect *GpaXI<sub>spl</sub>* resistance QTL, following potato-cyst nematode infection.

## **Acknowledgments**

We warmly thank Dr MC Kerlan, who provided plant material, C. Garchery for advice on experimental procedure and Rebecca Stevens for critical reading of the manuscript. We also thank the anonymous reviewers for helpful suggestions to improve the manuscript. This study was financially supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the European project APOPHYS (QLRT-2001-01849). PCQ was funded by a PhD grant of the Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENESCYT) of Ecuador.

■ R5S11 NI   
 ▨ R5S11 I   
 ■ R5R11 NI   
 ▨ R5R11 I



**Figure 4.2** : Niveaux d'expression relative des gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429, normalisés avec les gènes de référence RPN7, UBP22, MST2 et OXA1 (Castro-Quezada et al. 2013). Les amorces Q212 et Q216 ont permis d'amplifier spécifiquement les gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429. Les résultats sont présentés en fonction de l'allèle de résistance (R5R11) ou de sensibilité (R5S11) au QTL mineur GpaXIspl, en conditions inoculée (I) et non inoculée (NI), pendant une cinétique à trois points (6 h = 6 heures après inoculation, 2 j = 2 jours après inoculation, et 4 j = 4 jours après inoculation). Les barres d'erreur indiquent l'écart type de l'échantillon. La significativité des différences entre les niveaux d'expression a été déterminées avec le logiciel REST (Pfaffl et al. 2002).

#### 4.2.2. Expression différentielle des gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*

De nombreux gènes impliqués dans la défense des plantes vis-à-vis des pathogènes sont différentiellement exprimés suite à l'infection par des nématodes. Dans l'interaction entre le soja et les nématodes à kyste, différents gènes appartenant aux familles multigéniques des PR-10, des peroxydases ou des facteurs de transcription de type WRKY peuvent être soit induits soit réprimés, que ce soit dans des interactions compatibles ou incompatible. De nombreux gènes NBS-LRR sont induits durant l'interaction incompatible, particulièrement dans la sous-famille des TIR-NBS-LRR (Klink et al. 2007).

Pour étudier l'implication dans la résistance à *G. pallida* des gènes candidats *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*, localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>*, leur niveau d'expression a été analysé par RT-qPCR sur des racines de pomme de terre inoculées par *G. pallida* (à 6 heures, 2 jours et 4 jours post-inoculation) ou non inoculées. Le matériel végétal utilisé est composé d'individus issus de la population 96D31, ayant servi à la cartographie des QTL (Caromel et al. 2005) classés en deux combinaisons alléliques aux QTL : R5S11 pour les trois individus portant l'allèle de résistance au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de sensibilité au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* et R5R11 pour les trois individus portant l'allèle de résistance aux deux QTL. Un total de 36 échantillons a donc été analysé (3 individus x 2 combinaisons alléliques aux QTL x deux conditions d'inoculation x 3 points de cinétique). Les amorces Q212 et Q216 ont été définies sur les séquences des exons 4 de chaque gène candidat (*Spl\_TNL18429* et *Spl\_TNL18428* respectivement). L'analyse statistique des résultats d'expression génique a été faite avec le logiciel REST, en utilisant comme gènes de référence RPN7, MST2, UBP22 et OXA1 (voir article dans Plant Mol Biol Rep).

Les résultats sont présentés sur la figure 4.2. Aucune différence significative du niveau d'expression n'a été détectée entre les deux combinaisons alléliques R5R11 et R5S11, ni entre les deux conditions "inoculée" et "non-inoculée", que ce soit pour le gène *Spl\_TNL18428* ou pour le gène *Spl\_TNL18429*. En revanche, des différences significatives de niveaux d'expression ont été mises en évidence, pour les deux gènes, entre l'ensemble des échantillons prélevés à 6 heures par rapport à l'ensemble des échantillons prélevés à 4 jours (x 3,70 pour le gène *Spl\_TNL18428* et x 2,55 pour le gène *Spl\_TNL18429*). On retrouve ces différences significatives entre les points de cinétique, aussi bien dans les échantillons issus de racines inoculées, que dans les échantillons issus de fragments prélevés au même niveau dans des racines non inoculées. On ne peut donc pas attribuer cette augmentation du niveau

**Tableau 4.3 :** Motifs détectés dans le promoteur du gène Spl\_TNL18428 et décrits comme étant impliqués dans des interactions plantes-pathogènes

<b>Name of cis element</b>	<b>Sequence</b>	<b>Function</b>	<b>Reference</b>
TATA box	aataaa	Formation of a transcription initiation complex	Patikoglou et al. 1999
ERE	atttcaaa	Ethylene-responsive element	Itzhaki et Woodson 1993
GT-1 Box	gaaaaa	Pathogen induced expression	Park et al. 2004
GARE-motif	tctgttg	Defense and stress responsiveness	Pastuglia et al. 1997
GCC Box	gccgcc	GA-responsive element	Chakravarthy et al. 2003,
		Pathogen-responsive genes	Brown et al. 2003
TC-rich repeat	atattattca	Defense and stress responsiveness	Diaz-De-Leon et al. 1993
W Box	ctgact	Elicitor-responsive transcription	Yamamoto et al. 2004
TGAC-containing W-box	tgac	Pathogenesis-Related Class10 (PR-10) genes	Eulgem et al. 1999
LEMMI9	caattg	Elicitor-responsive transcription	Escobar et al. 1999

d'expression des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 à une réponse liée à la mise en place du syncytium mais plutôt à la position du fragment prélevé par rapport à la pointe de la racine. L'absence d'effet significatif entre les conditions "inoculée" et "non-inoculée" et, entre les deux combinaisons alléliques R5R11 et R5S11 pourrait être due à l'effet d'un facteur de dilution ou/et à la faible puissance de notre dispositif expérimental.

### **4.3. Localisation tissulaire de l'expression du gène Spl\_TNL18428**

Pour localiser au niveau tissulaire l'expression du gène Spl\_TNL18428, nous avons isolé et séquencé un fragment génomique de 1706 pb correspondant au promoteur du gène Spl\_TNL18428 lequel a été fusionné avec un gène rapporteur GFP. Cette construction a été utilisée pour transformer un clone de pomme de terre portant l'allèle de sensibilité au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et l'allèle de résistance au QTL *GpaXI<sub>spl</sub>* (S5R11). L'activité du promoteur du gène Spl\_TNL18428 fusionné au gène rapporteur GFP dans les plantes transgéniques a été analysée à 6 heures, 2 jours et 4 jours après inoculation par des nématodes *G. pallida*.

#### **4.3.1. Clonage et analyse bioinformatique de la séquence du promoteur du gène Spl\_TNL18428**

Nous avons cloné et séquencé une région génomique de 1706 pb, située en amont du site d'initiation de la traduction du gène Spl\_TNL18428 et immédiatement en aval de la séquence codante du gène précédant (Spl\_mTERF18453). Nous avons supposé que ce fragment contenait le promoteur complet du gène candidat Spl\_TNL18428 localisé au locus *GpaV<sub>spl</sub>* (Figure 4.3). Nous avons fait une recherche d'homologie entre la séquence du promoteur et les motifs impliqués dans la régulation des gènes de plantes, présents dans deux bases de données : PLACE (Higo et al. 1998) et Plantcare (Lescot et al. 2002) (Figure 4.3 et tableau 4.3).

Un motif TATA-box est situé 25 base avant le site d'initiation de la transcription, qui avait été déterminé par 5'RACE. Nous avons trouvé plusieurs motifs dans le promoteur du gène Spl\_TNL18428, ayant été décrits dans les promoteurs de gènes impliqués dans les réactions de défense chez différentes espèces. Par exemple, nous avons trouvés une boîte W (CTGACY) à -1075 pb en amont de l'ATG, impliquée dans la réponse transcriptionnelle de gènes de défense chez le tabac (Yamamoto et al. 2004) ; une boîte GT-1 (GAAAAA) à -504 pb, qui joue un rôle dans l'expression des gènes Scam-4 face aux pathogènes (Park et al



-1706 aagtaagcaatcttttctatgagtagagtcgattttgtatatgttggaatcattagagtaataactaaatgtttaacatatattc  
 -1616 attgtggttagatgtacattttgcgataaagtaatgattttatccttgatgtggcttcttcatggttttattgtttctcgtggaatgc  
 -1524 aattcgaagtttgctatgctcgtgtgtgtttaagfattaatftagtagcttgcaactttgcaagggttagttcattggcattgg  
 -1429 cgatgatgcataagtttaatggttgaatgactatgttatacgttcgaataaftgaagtagctagaaactgttatgcgagagtct  
     Core of TGAC-containing W-box  
 -1384 gttgcattctcttttctcatgctgaaacaatggttcaacaacgggtagtaagcaattaataacacatatgtccatgctttaattgttc  
     GARE-motif  
 -1260 ctttctataacacctgfttgacattgctcagcttctgccggccagagatttgcactattacatttctataagtagctcgatcc  
 -1172 cagactggttctactgaaagatgtgcttctccacgtctgtagaaaatcgtagactttgtgtgacatattctgttggtattccgtt  
 -1083 atctgactctatagatactcgaatcttatgtctagggcattctctataatatcaaacatgtactttcgaagcttgaaggttgcatt  
     W Box  
 - 994 gtagtttctccttctgttgaacctgggaagagttgtatctaccagtcaggtgcttctgatatatgagcgttaagttgggcta  
 - 907 gtgtttgccctttgtaaacctcaattatgtttgttccaattgaacacataatgaagtcttccataaatttatgctaaattgatttt  
     LEMMI9  
 - 815 atggtatactacattttattagaacaagctttgaggagctatattacatactcaaatatataactgcatatgtttttttttatgcaaa  
 - 724 taacaccattaatattgatcgtcactctctcgtttgccaaaaaaatatttataccatacatgtatatggaatttatgcataaatttta  
 - 634 taaaatgacaagtattgtgatccagctatttacagaagagatgacataaaaaatgagacgcaggagattttttattattaata  
 - 548 tgtaacaataaacagaaaataaggaggaaaagaaaaaacatttatagactataaatgaaggagaatatgaatgt  
     GT-1 Box  
 - 466 catttaactcttattaatcgtgaacattaaagtactattgcttcatttcaaacctaccgtttaattatgattttataatattgaggg  
     ERE  
 - 375 taaaagtaaatattcataaactactccctccattccatattaatgagatattttcattttcaaatcggacctttgtttttaatcaaat  
 - 283 ttttggcctgctggctattttattcaacttctgaaccaacatttagtacaaggactttggccaattaaataacaaaaca  
     TC-rich repeat  
 - 196 aaataaaaattaatctagaagatccagccaacaataatcaggttctagggcatttcacatttgtaaagtgaatggacaacagc  
     TATA box  
 - 112 catatcctccgcccttgtctgaattgtcaatacaaggactttgtccaaaatataatcaattgatctcatccataaaaaatattttt  
     GCC Box                      LEMMI9  
 - 24 ctttcagacaattaatcgaatctATG

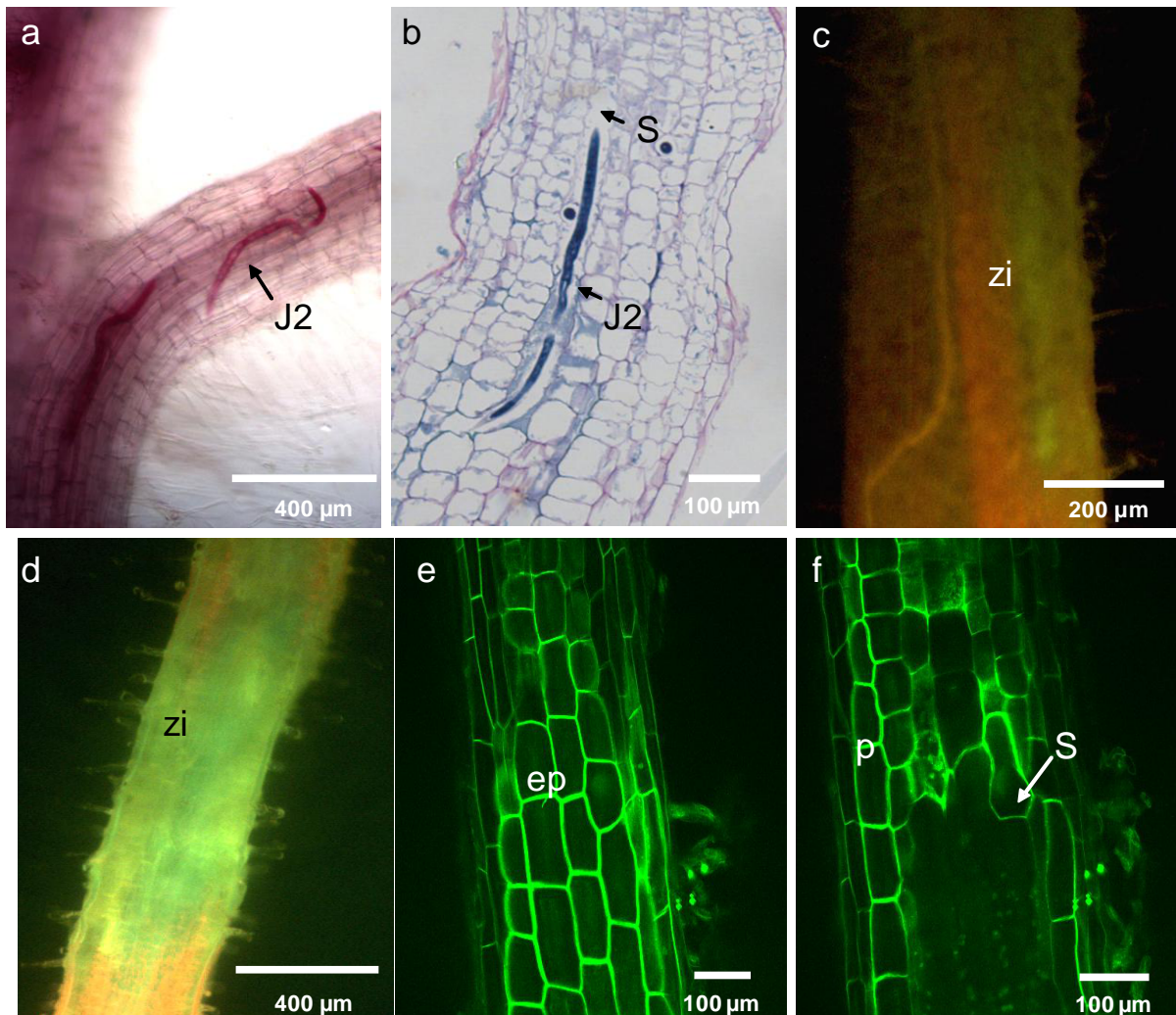
**Figure 4.3 :** Séquence du promoteur du gène Spl\_ TNL18428 et motifs putatifs agissant en *cis*. Les motifs putatifs agissant en *cis* sont surlignés en couleur et le nom est indiqué en dessous de la séquence. Le site d'initiation de la traduction est indiqué en caractères gras. La région 5'UTR, déterminée par 5'RACE, est indiquée en italique.

2004.) ; un noyau de boîte GCC (GCCGCC) à -96 pb impliqué dans de nombreuses réponses de gènes lors d'interactions compatibles avec des pathogènes (Brown et al. 2003, Chakravarthy et al. 2003, Park et al. 2004) ; et un noyau de boîte TGAC-W, à -1404 pb, qui est un répresseur transcriptionnel de la voie de signalisation de la gibbérelline (Eulgem et al. 1999). Nous avons également trouvé un élément de répétitions riches en TC : ATTTTATTCA (à -255 pb), impliqué dans des réponses aux bioagresseurs et aux stress (Diaz-De-Leon et al. 1993) ; un motif GARE (TCTGTTG) à -1380 pb, impliqués dans des réponses aux bioagresseurs et aux stress (Pastuglia et al. 1997) ; un élément réactif à l'éthylène (ERE : ATTTCAAA) à -414 pb (Itzhaki et Woodson, 1993) ; et deux éléments LEMMI9 (CAATTG), un à -1698 pb et un à -48 pb, impliqués dans la réponse transcriptionnelle aux nématodes chez la tomate (Escobar et al. 1999).

#### **4.3.2. Localisation tissulaire de l'activité du promoteur Spl\_TNL18428 dans des racines infectées par des nématodes**

Pour étudier la fonction du gène candidat Spl\_TNL18428, nous avons choisi de suivre l'expression du gène rapporteur GFP, placé sous le contrôle du promoteur du gène Spl\_TNL18428. Ainsi, des plantes de pomme de terre S5R11 ont été transformées par une construction contenant le gène GFP sous contrôle du promoteur Spl\_TNL18428. Six événements de transformation ont été obtenus, puis leurs racines ont été inoculées par des nématodes *G. pallida* au stade J2. L'expression du gène GFP a été suivie pendant 4 jours après inoculation et comparé à des racines témoins, dans six racines par transformant, pour les six transformants.

Dans les racines transgéniques non infectées, l'expression de la GFP a été détectée uniquement dans les apex racinaires et les racines latérales émergentes (données non présentées). Après inoculation des racines de chaque transformant par des nématodes juvéniles J2, la réaction de chaque racine a été suivie par microscopie pendant 4 jours. La figure 4.4a montre que les nématodes sont présents dans les tissus racinaires deux jours après inoculation. En effet, la section longitudinale (Figure 4.4b) de la racine deux jours après inoculation montre clairement la présence du nématode dans les cellules parenchymateuses racinaires et l'initiation d'un syncytium. La visualisation de fluorescence de la GFP deux jours après inoculation, indique une faible expression localisée dans la zone de pénétration du nématode (Figure 4.4c). Cette observation suggère que l'expression de la GFP dans cette zone coïncide avec la mise en place d'un site nourricier par les nématodes. Quatre jours après



**Figure 4.4 :** Localisation tissulaire de l'expression du gène GFP sous contrôle du promoteur Spl\_TNL18428 en réponse à l'infection par les nématodes.

**a :** Nématodes pénétrés dans le tissu racinaire deux jours après l'inoculation.

**b :** Section longitudinale d'une racine deux jours après inoculation.

**c :** Racine de pomme de terre deux jours après inoculation photographiée sous la loupe binoculaire à épifluorescence, montrant une faible expression du gène GFP localisée dans la zone de la racine correspondant à la zone de pénétration du nématode.

**d :** Augmentation de l'expression du gène GFP quatre jours après l'inoculation au nématode. La fluorescence GFP (verte) s'exprime dans la zone d'inoculation (zi). La fluorescence rouge correspond à l'autofluorescence des chloroplastes car les racines ont été cultivées dans la gélose à la lumière.

**e, f :** Zone d'inoculation par *G. pallida* dans une racine de pomme de terre photographiée sous microscope confocal. La fluorescence GFP est particulièrement intense dans les cellules parenchymateuses entourant le syncytium. ep : épiderme ; p : parenchyme ; s : syncytium, constitué de la fusion de plusieurs cellules sous l'action des sécrétions du nématode.

inoculation, une augmentation significative de l'expression de la GFP a été observée par comparaison aux résultats obtenus deux jours après inoculation (Figure 4.4d). Aucune expression de la GFP n'a été observée chez les racines témoins non transformées mais inoculés (données non présentées).

Les résultats de l'expression de la GFP ont été confirmés par microscopie confocale sur deux racines par transformant (Figure 4.4e,f). Nos résultats indiquent que l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *Spl\_TNL18428* n'est pas induite dans le syncytium mais dans les cellules qui l'entourent. Pour confirmer que l'expression de la GFP est liée à l'activation du promoteur du gène *Spl\_TNL18428* par des nématodes à kyste *G. pallida*, nous avons fait des essais complémentaires en utilisant d'autres bioagresseurs. Pour les 6 clones transgéniques, nous avons infecté des racines avec des masses d'œufs de nématodes à galles *Meloidogyne incognita* et des feuilles avec l'oomycète *Phytophthora infestans*. Les résultats obtenus montrent clairement que ces transformants ne présentent aucune fluorescence résultant de l'expression de la GFP sous contrôle du promoteur du gène *Spl\_TNL18428*. Seules les racines infectées par *G. pallida* expriment la GFP par activation du promoteur.

#### 4.4. Conclusions

Les données du séquençage du génome de *S. phureja*, espèce apparentée à la pomme de terre, nous ont permis de mettre en évidence que le locus contenant les deux gènes mTERF et TIR-NBS-LRR (TNL) était dupliqué chez *S. sparsipilum* et comprenait dans l'ordre, les gènes *Spl\_mTERF18430*, *Spl\_TNL18429*, *Spl\_mTERF18453* et *Spl\_TNL18428*. Les gènes TIR-NBS-LRR sont des gènes de résistance classiques, nous nous sommes donc intéressés, en premier lieu, au degré d'implication des deux gènes *Spl\_TNL18429* et *Spl\_TNL18428* dans la résistance de la pomme de terre à *G. pallida*. Pour définir des amorces spécifiques et pour apporter une réponse à la possible implication des deux gènes TNL dans la résistance à *G. pallida*, une comparaison entre les séquences des deux gènes a été effectuée. Les deux gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* présentent de forts pourcentages d'identité aux niveaux nucléotidique et protéique, et les variations les plus significatives se trouvent dans le domaine LRR. Ces deux gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* sont exprimés de façon constitutive, ce qui soutient l'idée qu'ils sont fonctionnels et pourraient être nécessaires pour déclencher la résistance à *G. pallida*. Ces deux gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* sont localisés en tandem, ce qui soutient l'idée que la fonction coopérative de deux gènes pourrait être

nécessaire pour déclencher un mécanisme commun de défense contre *G. pallida*. Pour étudier l'implication des deux gènes dans la résistance à *G. pallida*, leur niveau d'expression a été analysé par RT-qPCR à partir de racines de pomme de terre inoculées par *G. pallida* (à 6 heures, 2 jours et 4 jours post-inoculation) ou non inoculées. Au cours de ce travail, nous n'avons pas déterminé de différences significatives dans les racines par RT-qPCR, entre conditions inoculées et non inoculées pour les gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429. Nous pensons qu'une éventuelle différence d'expression pourrait être sous-estimée, à cause d'un facteur de dilution important entre le nombre de cellules présentes dans les fragments de 5 mm de racines prélevées, par rapport aux quelques cellules impliquées dans l'interaction avec les nématodes, particulièrement dans les phases précoces.

Cependant, l'approche par fusion promoteur-gène rapporteur a permis de confirmer que l'expression du gène Spl\_TNL18428 est corrélée avec la résistance au nématode. La localisation tissulaire de l'expression du gène Spl\_TNL18428 a été évaluée par l'expression de la GFP sous control du promoteur du gène Spl\_TNL18428, dans des racines de plantes de pommes de terre transformées, suite à l'infection par des nématodes à kyste *G. pallida*. Toutes les plantes transformées ont montré une activité GFP dans la région inoculée. L'activité GFP augmente jusqu'à atteint son maximum quatre jours après l'inoculation et elle est induite localement dans les couches cellulaires situées autour du syncytium lors de l'infection.

## Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

La résistance trouvée chez l'accession spl88S.329.18, issue de l'espèce *S. sparsipilum*, est caractérisée par un déterminisme oligogénique, avec un QTL à effet fort (*GpaV<sub>spl</sub>*) et un QTL mineur (*GpaXI<sub>spl</sub>*). La résistance, conférée par l'action conjointe des deux QTL, est caractérisée par une nécrose autour du syncytium, visible au bout de quelques jours après pénétration du nématode à kyste *G. pallida* dans la racine (Caromel et al 2005). La cartographie fine avait permis l'identification d'une région génomique de 30 kb, dans laquelle deux gènes candidats avaient été annotés : un gène appartenant à la famille des « mitochondrial, transcription termination factor » (mTERF) et un gène TIR-NBS-LRR (TNL), gène de résistance classique. En 2011, les données du séquençage du génome de *S. phureja*, espèce apparentée à la pomme de terre, nous ont permis de mettre en évidence que la région génomique contenant les deux gènes mTERF et TNL était en réalité dupliqué chez *S. sparsipilum* et comprenait dans l'ordre, les gènes Spl\_mTERF18430, Spl\_TNL18429, Spl\_mTERF18453 et Spl\_TNL18428. Les analyses impliquant des étapes de transformation génétique n'ont été effectuées que sur un gène TNL (Spl\_TNL18428) et/ou un gène mTERF (Spl\_mTERF18430).

### 5.1. Quel est ou quels sont le(s) gène(s) sous-jacent(s) au QTL *GpaV<sub>spl</sub>* ?

Avant la mise en évidence de la duplication du locus *GpaV<sub>spl</sub>*, notre équipe n'avait identifié que les deux gènes candidats Spl\_TNL18428 et Spl\_mTERF18430. De nombreux gènes de résistance décrits appartiennent à la famille des gènes TIR-NBS-LRR (Kaloshian et al. 2011). Deux gènes de résistance au nématode à kyste *G. rostochiensis*, le gène *Gro1-4*, caractérisé chez la pomme de terre et le gène *Ma* caractérisé chez *Prunus cerasifera* appartiennent à cette famille (Paal et al. 2004, Claverie et al. 2011). Nous avons décidé d'étudier l'implication du gène candidat Spl\_TNL18428 dans la résistance à *G. pallida* par deux stratégies : l'extinction génique à partir d'une plante résistante et la complémentation de plantes sensibles au locus *GpaV<sub>spl</sub>* avec l'allèle lié à la résistance. Des plantes sensibles à *G. pallida*, transformées avec l'allèle de résistance au gène Spl\_TNL18428, ont été évaluées pour leur résistance à *G. pallida* par un test *in vitro* sur boutures, en 2009-2010, et par un test en pot sur plantes entières, en 2012. Les résultats suggèrent que le gène Spl\_TNL18428 est impliqué dans la résistance à *G. pallida* mais que son effet sur la résistance n'est que partiel,

comme nous avons pu le mettre en évidence lors du test *in vitro* (chapitre 3). Lors du test de résistance en pot, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences significatives entre les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428 et les témoins. Nous ne pouvons pas exclure que cet effet partiel mesuré *in vitro*, et que l'absence de résistance mesurée lors du test en pot, ne soient dues à des effets épigénétiques entraînant une diminution progressive de la résistance dans les plantes transgéniques, comme cela a été constaté pour le gène *Mi-1.2*, conférant la résistance aux nématodes à galles chez la tomate (Goggin et al. 2004).

Les deux gènes TIR-NBS-LRR localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* ont un fort pourcentage d'identité nucléotidique. Aussi, le vecteur ARNi, initialement construit pour éteindre l'expression du seul gène TIR-NBS-LRR identifié initialement, diminue en réalité l'expression des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429. Dans les plantes résistantes à *G. pallida*, transformées avec ce vecteur, le niveau de sensibilité augmente considérablement et les nombres de kystes retrouvés sur une de ces plantes sont similaires aux nombres de kystes retrouvés sur des plantes possédant l'allèle de sensibilité au locus *GpaV<sub>spl</sub>* (chapitre 4). Néanmoins, les résultats d'expression génique par ARNi peuvent exclure un gène candidat potentiel, mais ces expériences ne permettent pas d'apporter la preuve formelle que le gène candidat est bien celui qui confère la résistance. La sensibilité conférée à une plante résistante, suite à la diminution de l'expression d'un gène par ARNi, révèle l'implication de ce gène dans la résistance, mais ne donne aucune indication sur la position de ce gène dans les cascades de signaux impliqués dans la réaction de défense. Seule la complémentation fonctionnelle par transformation génétique peut apporter la preuve formelle que le gène candidat est bien celui qui confère la résistance au locus étudié. Les résultats de cette expérience indiquent donc que l'un des deux gènes TIR-NBS-LRR, ou les deux, sont impliqués dans la résistance à *G. pallida*.

Les deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 présentent des forts pourcentages d'identité nucléotidique et des forts pourcentages d'identité et de similarité protéiques (Chapitre 4). Les pourcentages d'identité protéiques que nous avons trouvée entre Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 (87,7 %) sont similaires aux pourcentages d'identité observés pour d'autres couples de gènes de résistance appartenant à un même cluster, même si ces gènes confèrent la résistance à des pathogènes différents. C'est le cas en particulier des gènes *Gpa2* et *Rx1* de la pomme de terre qui ont 88% d'acides aminés en commun, bien qu'ils confèrent la résistance à un nématode et à un virus respectivement (Van der Vossen et al. 2000). Les moitiés N-terminales de *Gpa2* et *Rx1* partagent 92% d'identité alors que les

moitiés C-terminales, comprenant le domaine LRR, partagent 84% d'identité en acides aminés. Les pourcentages d'identité protéique entre les gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 sont également plus élevés dans les domaines TIR (98 %) et NB-ARC (97,4 %) situés en position N-terminale, qu'entre les domaines LRR (89,7 %).

Le domaine LRR, et dans une moindre mesure le domaine TIR, ont été proposés comme étant les principaux domaines responsables de la reconnaissance d'effecteurs des pathogènes (Padmanabhan et al. 2009). Pour cette raison, il est attendu que ces domaines soient plus divergents que les autres domaines. Si les deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 sont impliqués dans la résistance à *G. pallida*, et si on se place dans l'hypothèse d'un modèle de garde (Dangl et Jones 2006), la divergence observée au niveau du domaine LRR pourrait s'expliquer par le fait qu'ils "gardent" deux protéines différentes d'un même complexe, ces protéines pouvant être les cibles d'un même ou de plusieurs effecteurs de *G. pallida*. Sinon, dans une hypothèse d'interaction directe, les deux gènes pourraient interagir directement avec des effecteurs différents de *G. pallida*. Une telle coopération entre deux gènes de résistance peut être nécessaire pour déclencher un mécanisme commun de défense contre certains pathogènes, comme cela a été montré pour les gènes *RRS1* et *RPS4*, lesquelles confèrent conjointement la résistance au champignon *Colletotrichum higginsianum* (Narusaka et al. 2009).

Les pourcentages d'identité sont également élevés entre gènes NBS-LRR provenant d'espèces différentes. Nous avons comparé les séquences en acides aminés de Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 avec le gène *Bs4*, orthologue de ces deux gènes qui confère la résistance à *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* chez la tomate. *Bs4* code une protéine de 1146 acides aminés. Le pourcentage d'identité entre *Bs4* et Spl\_TNL18428 ou Spl\_TNL18429 est de 80 %, et la divergence est surtout importante au niveau du domaine LRR avec 74 % d'identité, contre 97 % dans le domaine TIR. D'autres couples de gènes NBS-LRR montrent un pourcentage d'identité élevé, bien qu'ils appartiennent à des espèces différentes et confèrent la résistance à différents pathogènes. C'est le cas, par exemple, des gènes *Mi-1* et *Rpi-blb2*. Le gène *Mi-1* de la tomate confère la résistance aux nématodes *Meloidogyne* (Milligan et al. 1998, Vos et al. 1998), au puceron de la pomme de terre *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi et al. 1998), au psylle de la tomate *Bactericerca cockerelli* (Casteel et al. 2006) et à l'aleurode *Bemisia tabaci* (Nombela et al. 2003). Le gène homologue *Rpi-blb2* chez *S. bulbocastanum*, localisé au niveau d'un locus colinéaire au locus *Mi*, confère la



résistance à l'oomycète *P. infestans* (Van der Vossen et al. 2005). Les deux gènes partagent 81 % d'identité au niveau protéique.

Chez les plantes, la plupart des gènes NBS-LRR sont localisés dans des clusters de gènes de résistance répartis sur quelques dizaines à quelques centaines de kilobases. Ces clusters seraient la conséquence d'événements de duplication génique et permettraient de générer rapidement de nouvelles spécificités d'interactions avec des effecteurs de différents pathogènes (Dodds et al 2001, Ellis et al 2000). Parmi les cinq gènes de résistance aux nématodes appartenant à la famille NBS-LRR, seul *CaMi* n'a pas été décrit comme faisant partie d'un cluster, parce qu'il a été amplifié par PCR à partir de la séquence de Mi-1.2 sans connaissance de l'organisation génomique du locus. Le gène *Gpa2* se situe dans un cluster de quatre gènes structurellement proches, dont deux sont décrits comme des gènes de résistance fonctionnels chez la pomme de terre (*Gpa2* et *Rx*). Fait intéressant, ces deux gènes reconnaissent des organismes distincts phylogénétiquement. Alors que *Gpa2* confère une résistance à *G. pallida*, *Rx* confère une résistance au virus X (van der Vossen et al 2000). Le locus *Gro1* contient environ 14 gènes étroitement liés, mais seul *Gro1-4* a été caractérisé comme conférant une résistance aux maladies (Paal et al 2004). Le gène *Hero* chez la tomate est le seul membre caractérisé comme conférant une résistance dans un cluster de 14 gènes NBS-LRR, localisés dans une région de 118 kb (Ernst et al 2002). La famille des gènes *Mi* comprend 7 paralogues disposés en deux groupes de trois et de quatre membres (Seah et al. 2004, 2007, Vos et al. 1998). Un seul de ces gènes, *Mi-1.2*, confère un large spectre de résistance dont la résistance à trois espèces de nématodes à galles (Milligan et al 1998). Le gène *Ma* est localisé dans un cluster de trois gènes TIR-NBS-LRR (Claverie et al. 2011).

La structure des clusters de gènes de résistance a évolué moins vite chez la tomate que chez la pomme de terre, où ces clusters ont subi une expansion. Chez les deux espèces de tomate, *Solanum lycopersicum* et *Solanum peruvianum*, la similitude de structure et l'organisation des locus *Mi-1* pourrait suggérer que le locus n'a pas beaucoup évolué depuis la divergence des deux espèces. Alors que *Mi-1* et six autres homologues sont localisés dans deux clusters liés sur le chromosome 6 de la tomate, chez la pomme de terre, au moins 15 homologues ont été identifiés (Van der Vossen et al. 2005). Cette expansion des clusters de gènes de résistance chez la pomme de terre a été constatée au niveau du génome entier (Andolfo et al. 2013). C'est particulièrement le cas pour les gènes de la sous-famille TIR-NBS-LRR. Cela expliquerait pourquoi le locus *Bs4* de la tomate, comprenant un seul gène

TIR-NBS-LRR, a été dupliqué chez la pomme de terre, donnant naissance aux deux gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*.

Les résultats du test de résistance en pot sur les plantes transformées avec la construction ARNi montrent une augmentation conséquente de la sensibilité des plantes transformées et suggèrent l'implication d'au moins l'un des deux gènes TNL, voire des deux, dans la résistance. Les résultats du test *in vitro* sur les plantes complémentées avec l'allèle de résistance au gène *Spl\_TNL18428* suggère l'implication de ce gène dans la résistance, même si c'est pour une faible part. Ces résultats pourraient s'expliquer si les deux gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* étaient nécessaires pour obtenir la totalité de la résistance conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>*. Cette hypothèse est cohérente avec les démonstrations récentes concluant que plusieurs gènes NBS-LRR peuvent être nécessaires à l'expression d'une résistance (Eitas et Dangl 2010). Ainsi, chez *Arabidopsis*, la résistance à *Hyaloperonospora parasitica* est conférée par les deux gènes TIR-NBS-LRR, *RPP2A* et *RPP2B* qui sont liés en tandem sur le même chromosome (Sinapidou et al. 2004). Toujours chez *Arabidopsis*, la résistance à *Colletotrichum higginsianum* est due aux deux gènes TIR-NBS-LRR, *RRS1* and *RPS4* qui sont membres d'un même cluster de gènes de résistance (Narusaka et al. 2009). D'autres exemples impliquant deux gènes CC-NBS-LRR ou un gène TIR-NBS-LRR et un gène CC-NBS-LRR ont été décrits chez le riz (Ashikawa et al. 2008, Lee et al. 2009, Wen et al. 2011, Zhai et al. 2011), chez le blé (Loutre et al. 2009), chez le soja (Wen et al. 2013) et chez le tabac (Peart et al. 2005). Il a également été montré que les gènes TIR-NBS-LRR pouvaient former des oligomères suite à la perception d'un effecteur du pathogène (Mestre et Baulcombe 2006). Cette oligomérisation a lieu via le domaine TIR (Bernoux et al. 2011).

**En tenant compte des données récentes sur le fonctionnement des gènes NBS-LRR et de nos résultats d'analyse fonctionnelle, on peut émettre l'hypothèse que les deux gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* sont nécessaires à l'expression de la résistance à *G. pallida*, et que ces deux gènes interagissent via leur domaine TIR.**

Les deux gènes mTERF localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* sont-ils également impliqués dans la résistance ? Même si 19 des 20 gènes possédant un domaine mTERF colocalisent avec des QTL de résistance chez le riz (Wisser et al. 2005), aucun gène appartenant à cette famille n'a été décrit comme étant impliqué dans des réactions de résistance chez les plantes. Nous ne possédons pas de données expérimentales pour le gène *Spl\_mTERF18453*. La résistance à *G. pallida* des plantes transformées avec le gène *Spl\_mTERF18430* a été évaluée par un test

en pot sur une saison de culture. Les nombres de kystes collectés sur les plantes transformées avec ce gène ne sont pas significativement différents de ceux collectés sur les plantes témoins, ce qui semble invalider l'implication de ce gène dans la résistance à *G. pallida*. Toutefois, ils ne sont pas non plus significativement différents de ceux collectés sur les plantes transformées avec le gène Spl\_TNL18428, dont nous soupçonnons l'implication dans la résistance à *G. pallida*. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'implication de ce gène dans la résistance.

## **5.2 Comment les gènes TIR-NBS-LRR localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* sont-ils exprimés ?**

Nous avons abordé l'étude de la régulation des gènes TIR-NBS-LRR localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* par deux approches : *via* l'étude du promoteur et l'expression *in planta* du promoteur fusionné au gène rapporteur GFP pour le gène Spl\_TNL18428, et *via* la mesure du niveau d'expression par RT-qPCR pour les deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429.

L'expression du gène rapporteur GFP, placé sous le contrôle du promoteur du gène Spl\_TNL18428, coïncide avec la mise en place d'un site nourricier par les nématodes. En effet, plusieurs études ont démontré que la réaction de résistance, conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>*, est initiée environ 2 jours après la pénétration du nématode dans la racine, une fois que syncytium commence à se former (Caromel et al. 2005, Jolivet et al. 2007, Muniéry et al. 2001). De plus, la fluorescence GFP s'exprime dans la même zone de la racine que là où a été observée une réaction de défense, caractérisée par une nécrose, dans les plantes possédant les allèles de résistance aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>* (Caromel et al. 2005). Nos résultats montrent aussi que l'expression de la GFP placé sous le contrôle du promoteur est localisée autour et non pas dans le syncytium. Des gènes codant des expansines, s'expriment également dans les couches cellulaires contigües aux sites nourriciers lors de l'infection des racines par des nématodes (Bar-Or et al. 2005, Gal et al. 2006). L'expression du gène *LeEXPA5* (expansine isoforme), impliqué dans la modification des parois cellulaires des sites nourriciers développé par *M. javanica*, est induite uniquement dans les tissus entourant des cellules géantes à 4 et 10 jours après inoculation (Bar-Or et al. 2005). De plus, l'ARNm d'un autre gène codant une expansine, le gène *LeEXPA4*, induit dans les racines de tomate suite à l'inoculation par *G. rostochiensis*, a été localisé dans les parties périphériques du syncytium à 3 et 5 jours après inoculation (Gal et al. 2006). Il est intéressant de constater que, sur le

génomique de la pomme de terre, un gène codant une expansine est localisé à proximité immédiate du locus *GpaV<sub>spl</sub>* (Spl\_Exp18431, figure 1.13).

L'expression de la GFP, dans les plantes transformées avec la fusion promoteur Spl\_TNL18428::GFP, n'a pas été observée suite à des inoculations de racines avec *Meloidogyne incognita* ou avec l'oomycète *Phytophthora infestans*. L'expression du gène Spl\_TNL18428, via son promoteur, est donc activé uniquement lors de l'infection par le nématode à kyste *G. pallida*. Des résultats similaires ont été obtenus chez le tournesol avec le promoteur du gène *Hahsp17.7G4*. Il a été constaté que l'expression du gène *Hahsp17.7G4* est activée uniquement dans les cellules géantes induites par les nématodes à galles, et qu'elle n'est pas activée dans les syncytiums induits par les nématodes à kystes, ce qui révèle une spécificité dans la réaction des plantes à différentes espèces de nématodes (Barcala et al. 2008, Escobar et al. 1999, 2003). Certains gènes s'expriment uniquement lors de la formation du syncytium (de Meutter et al. 2005) tandis que d'autres sont spécifiques à la formation des cellules géantes (Escobar et al. 2003). Cependant, d'autres gènes, tels que *LEMMI9*, sont induits par les deux espèces de nématodes bien que la réponse aux nématodes à kystes soit plus faible (Van der Eycken et al. 1996, 1999, De Meutter et al. 2005).

Nous avons identifiés plusieurs motifs dans le promoteur du gène Spl\_TNL18428. Ces motifs ont été rapportés comme étant présent dans les promoteurs de gènes activés par les nématodes ou induits lors de réaction de défense dans d'autres pathosystèmes (Chapitre 4.3.1). L'expression du gène Spl\_TNL18428 pourrait être induite par des effecteurs ciblant en parallèle directement ou via des facteurs de transcription, des motifs présents à la fois dans les promoteurs de gènes nécessaires au cycle infectieux et dans le promoteur du gène Spl\_TNL18428. Un de ces motifs, présent dans le promoteur du gène Spl\_TNL18428, a été caractérisé dans le promoteur du gène *LEMMI9* fortement induit dans les cellules géantes et dans les galles (Escobar et al. 1999). Le même motif est retrouvé dans le promoteur du gène *HsI<sup>pro-1</sup>* qui confère la résistance au nématode à kyste *Heterodera schachtii* chez la betterave sucrière. Ce gène est spécifiquement exprimé au niveau du syncytium (Thureau et al. 2003). Certains motifs pourraient également être impliqués dans l'activation du gène Spl\_TNL18428 par les nématodes, via l'activation de gènes de synthèse des hormones comme l'acide jasmonique, l'acide salicylique ou l'éthylène, associés à la réponse aux nématodes et à d'autres bioagresseurs (Goverse et Bird 2011). La dissection moléculaire des promoteurs de différents gènes impliqués dans la résistance aux bioagresseurs a permis de mettre en évidence des motifs *cis*-régulateurs, jouant un rôle dans l'activation de diverses voies de signalisation qui

suivent l'infection par un pathogène (An et al. 2009, Brown et al. 2003, Chakravarthy et al. 2003, Choi et al. 2004, Germain et al. 2012, Hong et Hwang 2006, Hur et al. 2008, Jung et al. 2005, Lee 2011, Lee et Hwang 2006, Lee et al. 2007, Park et al. 2004, Shetty et al. 2012, Sohn et al. 2006, Thureau et al. 2003, Wu et Xie 2011, Yamamoto et al. 2004). Nous avons identifiés plusieurs motifs putatifs agissant en *cis*, pouvant être associés à l'activation de la réaction de défense. Des motifs, tels que les boîtes GCC et ERE ont été trouvés dans de nombreux promoteurs de gènes de protéines PR (Pathogenesis-Related). Ils sont reconnus par les facteurs de réponse à l'éthylène (ERF). Par exemple, chez *Arabidopsis* et chez le tabac, la boîte GCC peut interagir spécifiquement avec un ERF, après infection par un pathogène (Onate-Sanchez et Singh 2002, Ohta et al. 2000 respectivement). Chez *Arabidopsis*, la boîte GCC interagit avec un ERF1 et ce motif est impliqué dans les voies de signalisation de l'éthylène et de l'acide jasmonique (Lorenzo et al. 2003). Le facteur de transcription Pti4 est suspecté d'être un régulateur de l'expression de gènes de défense de la tomate *via* la boîte GCC (Chakravarthy et al. 2003). Le rôle de l'éthylène a été largement étudié chez *Arabidopsis*. Des mutants surexprimant l'éthylène ont montré que l'augmentation du niveau de l'éthylène est favorable à l'initiation du syncytium dans les racines (Goverse et Bird 2011). De plus, ces mutants montrent que la dégradation de la paroi cellulaire induite par l'éthylène est impliquée dans le développement du syncytium (Gheysen et Fenoll 2002). L'éthylène peut également modifier la forme des cellules, par l'intermédiaire de modifications du cytosquelette. Ainsi, l'éthylène apparaît comme un autre acteur dans l'interaction plante-nématode. Des motifs « Boîtes W » ont été identifiés dans des promoteurs liés à la résistance. Un élément putatif de réponse aux éliciteurs contenant deux boîtes W a été identifié dans un gène de chitinase de classe 1 chez le tabac (Yamamoto et al. 2004). Les chitinases font partie des protéines PR et plusieurs gènes codant des chitinases sont induits lors de l'infection par les nématodes (Rahimi et al. 1998, Grover et al. 2012). Un autre élément *cis*, le motif GT-1 a été trouvé comme étant impliqué dans l'expression du gène *Scam-4* face aux pathogènes chez le soja et chez *Arabidopsis* (Park et al. 2004). Un motif GARE a été trouvé dans le promoteur du gène *S* de la famille RLK (pour receptor-like kinase), il est impliqué dans la résistance à l'infection bactérienne par *Ralstonia solanacearum* chez *Brassica oleracea* (Pastuglia et al. 1997).

Nous avons également analysé l'expression des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 par RT-qPCR. Les deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 sont exprimés constitutivement dans les racines et dans les feuilles et ce niveau d'expression ne

semble pas varier suite à l'inoculation par les nématodes (Chapitre 4.2.2). Il est couramment rapporté dans la littérature que certains gènes de résistance sont exprimés constitutivement et que leur niveau d'expression, mesuré par RT-qPCR ou par Northern-blot, ne semble pas varier suite à l'inoculation par les pathogènes qu'ils ciblent. C'est le cas du gène *Bs4* de la tomate qui est l'orthologue des gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429* et qui confère la résistance à la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Schornack et al. 2005). C'est également le cas du gène *Mi-1.2* de la tomate, conférant la résistance à plusieurs pathogènes dont les nématodes à galles (de Ilarduya et Kaloshian 2001) et du gène *Gro1-4* conférant la résistance au nématode à kyste *G. rostochiensis* chez la pomme de terre (Paal et al. 2004). En revanche, d'autres gènes de résistance, comme les gènes de résistance aux nématodes *Hs1<sup>pro-1</sup>* de la betterave sucrière et le gène *Hero* de la tomate, sont induits lors de l'interaction incompatible (Cai et al 1997, Sobczak et al. 2005). Au niveau génomique, Klink et al (2007b) ont montré que des gènes de la famille TIR-NBS-LRR était induits lors de l'interaction incompatible entre le soja et *Heterodera glycines*, alors qu'aucun de ces gènes n'était induit lors de l'interaction compatible. Or, l'interaction entre les racines de plantes et les nématodes ne concerne que quelques cellules dans les stades précoces, alors que, dans les fragments de racines prélevés pour extraire les ARN nécessaires aux analyses moléculaires, plusieurs centaines voire plusieurs milliers de cellules sont généralement prélevées. Plusieurs études sur les interactions plantes-nématodes ont montré un effet de dilution très fort pour les transcrits provenant d'échantillons prélevés à partir de fragments de racines par rapport aux transcrits isolés à partir de cellules géantes ou de syncytiums (Ramsay et al. 2004, Barcala et al. 2010, Klink et al. 2005, Ithal et al. 2007b, Klink et al. 2007b, Szakasits et al. 2009). L'absence de variation d'expression suite à l'inoculation par *G. pallida*, que nous avons observé par RT-qPCR pour les gènes *Spl\_TNL18428* et *Spl\_TNL18429*, pourrait s'expliquer par cet effet de dilution. En effet, ce résultat est contradictoire avec les expériences que nous avons réalisées en fusionnant le promoteur du gène *Spl\_TNL18428* et le gène rapporteur GFP, où nous avons montré que l'expression de la GFP était spécifiquement induite autour du syncytium. L'observation directe de la fluorescence GFP en microscopie permet d'avoir directement accès aux cellules concernées par l'interaction entre la plante et le nématode et de s'affranchir de l'effet de dilution.

En conclusion, l'induction spécifique de l'expression du gène rapporteur GFP, placé sous le contrôle du promoteur du gène *Spl\_TNL18428*, dans les cellules situées autour du syncytium, renforce l'hypothèse d'une implication du gène *Spl\_TNL18428* dans la résistance à

*G. pallida*. En effet, il semble improbable que le gène Spl\_TNL18428 soit spécifiquement induit autour du syncytium, s'il ne jouait pas un rôle dans l'interaction, d'autant plus que la fluorescence GFP s'exprime dans la même zone de la racine que là où a été observée une réaction de défense, caractérisée par une nécrose, dans les plantes possédant les allèles de résistance aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>* (Caromel et al. 2005).

### **5.3. Comment peut-on expliquer la résistance conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>* ?**

La réaction de défense, dans les plantes possédant les allèles de résistance aux deux QTL *GpaV<sub>spl</sub>* et *GpaXI<sub>spl</sub>*, s'exprime par une nécrose autour du syncytium (Caromel et al. 2005). Nous avons démontré, au cours de ce travail, que deux gènes TIR-NBS-LRR (Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429), localisés dans l'intervalle du locus *GpaV<sub>spl</sub>* sont exprimés dans les racines de pomme de terre. Nous avons également démontré que le gène Spl\_TNL18428 est induit dans les cellules situées autour du syncytium. Un gène codant une expansine est localisé à proximité immédiate du locus *GpaV<sub>spl</sub>*. Or, Bar-Or et al. (2005) et Gal et al. (2006) ont observé l'induction par des nématodes de gènes codant des expansines dans les couches cellulaires situées autour de leur site nourriciers. Enfin, nous avons démontré que le gène Spl\_TNL18428 est insuffisant pour conférer à lui seul le niveau de résistance attribué au locus *GpaV<sub>spl</sub>* et nous savons, d'après d'autres études, que deux gènes NBS-LRR situés dans un même cluster peuvent être nécessaires pour conférer la résistance à un pathogène (Eitas et Dangl 2010).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la résistance conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>*:

- Un effecteur de *G. pallida* activerait l'expression du gène codant une expansine (Spl\_Exp18431). L'augmentation de la concentration d'expansine dans les cellules entourant le syncytium ou les modifications de la paroi cellulaire provoquée par cette augmentation, déclencherait l'induction de l'expression de Spl\_TNL18428 (et éventuellement Spl\_TNL18429).

- Un effecteur de *G. pallida* activerait l'expression de l'homologue du gène *LEMMI9*. Comme les promoteurs de Spl\_TNL18428 et de *LEMMI9* ont des motifs communs, les deux gènes seraient induits en même temps.

- L'augmentation de la concentration et/ou la modification des protéines Spl\_Exp18431 et *LEMMI9* entrainerait l'hétérodimérisation des protéines Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 et le déclenchement de la réaction de défense uniquement dans les cellules adjacentes au syncytium, là où la concentration de Spl\_Exp18431 a augmenté.

## 5.4. Perspectives

L'analyse des gènes candidats Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429, localisés au locus *GpaV<sub>spl</sub>*, est particulièrement intéressante pour avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires conférant la résistance au nématode *G. pallida*. L'exploitation des données acquises au cours de cette thèse reste cependant à approfondir ou la vérification des résultats de certaines expérimentations sont nécessaires. Par exemple, vu l'hétérogénéité des résultats obtenus lors du test de résistance en pot en 2012, ce test est reconduit cette année sur certains génotypes.

L'analyse fonctionnelle des gènes candidats, réalisée au cours de ma thèse, a montré que le gène Spl\_TNL18428 était impliqué dans la résistance à *G. pallida* mais que son effet était insuffisant pour conférer la totalité de la résistance attribuée au locus *GpaV<sub>spl</sub>*. Mes résultats suggèrent que le gène Spl\_TNL18429 pourrait également être impliqué dans la résistance et ce gène a été cloné. Dans les prochains mois, des plantes utilisées pour l'analyse fonctionnelle du gène Spl\_TNL18428 (96D31.75 -S5R11- et 96D31.69 -S5S11-) vont être transformés avec le gène Spl\_TNL18429, de même que les plantes transformées au cours de ma thèse par le gène Spl\_TNL18428. Les niveaux de résistance des plantes régénérées seront donc comparés pour déterminer si la résistance très forte conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>* est due à un effet additif des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 ou si le fort niveau de résistance conféré par ce locus est le résultat d'une interaction entre les deux gènes. Dans le premier cas, la quasi-totalité de la résistance doit être retrouvée dans les deux types de transformants (plantes transformées avec Spl\_TNL18429 ou plantes transformées avec Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429), car l'effet du gène Spl\_TNL18428 seul est très faible. Dans le second cas, le niveau de résistance des plantes transformées avec les deux gènes doit être bien plus élevé que le niveau de résistance des plantes transformées avec un seul des deux gènes. De plus, il est possible que la proximité des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 sur le génome soit nécessaire à l'expression de la résistance. Dans ce cas, il



faudrait construire un vecteur pour intégrer les deux gènes sur le même plasmide et transformer les plantes sensibles à *G. pallida* avec ce vecteur.

Etant donné que nos résultats ne nous permettent pas d'exclure le rôle des gènes mTERF dans la résistance, une autre perspective à long terme serait de faire une série de constructions comprenant des combinaisons des deux gènes TNL et des deux gènes mTERF et d'utiliser ces constructions pour transformer des plantes sensibles. Le niveau de résistance des plantes transformées serait comparé avec celui de plantes possédant la résistance au locus *GpaV<sub>spl</sub>*. La combinaison de gènes conférant un niveau de résistance similaire à celui de plantes possédant la résistance au locus *GpaV<sub>spl</sub>*, devrait comprendre tous les gènes du locus impliqués dans la résistance.

Il a été montré au cours de ma thèse que le gène rapporteur GFP, placé sous le contrôle du promoteur du gène Spl\_TNL18428, est spécifiquement induit dans les couches cellulaires entourant le syncytium. Une expérience similaire avec le promoteur du gène Spl\_TNL18429 permettrait de savoir si les deux gènes TNL ont un profil d'expression commun, suggérant une action coordonnée de ces deux gènes dans la résistance.

Des événements d'épissage alternatif ont été mis en évidence par RACE pour le gène Spl\_TNL18428 (Caromel et al. 2011), et ce mécanisme pourrait être impliqué dans la résistance comme cela a été montré pour le gène *N* chez le tabac (Dinesh-Kumar et Baker 2000). Des phénomènes d'épissage alternatifs ont également été détectés pour le gène Spl\_TNL18429. Quand le mode d'implication des deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 dans la résistance aura été clarifié, il serait intéressant de déterminer, si et comment, les phénomènes d'épissage alternatif interviennent dans le mécanisme de résistance. L'analyse fonctionnelle des deux gènes a été faite et va se poursuivre en utilisant les séquences génomiques, exons et introns compris. Afin de vérifier si l'épissage alternatif joue un rôle dans la résistance, il faudrait transformer des plantes sensibles avec des vecteurs comprenant les séquences des gènes sans leurs introns. Un autre moyen d'évaluer l'influence de l'épissage alternatif dans le mécanisme de résistance serait de quantifier spécifiquement chaque transcrite résultant d'épissage alternatif dans différentes conditions d'inoculation. Une telle quantification est difficile à réaliser par RT-qPCR car on ne peut cibler qu'une portion du gène (deux exons et un intron) et, à cause de leur fort pourcentage d'identité nucléotidique, il est difficile de définir des amorces amplifiant spécifiquement chaque TNL, pour tous les exons. En revanche, les technologies de séquençage de troisième génération permettent de

séquencer de grands fragments (les ARNm transcrits à partir des deux gènes TNL peuvent dépasser les 4 kb) avec un haut débit, et offrent la possibilité de quantifier tous les événements résultant d'épissage alternatif pour ces deux gènes.

Il serait également envisageable de tester notre hypothèse d'hétérodimérisation des deux protéines Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 par des tests d'interaction protéine-protéine. Un des tests d'interaction les plus couramment utilisés est le système d'interaction en double-hybride chez la levure. Une des limitations de ce système est qu'il ne fonctionne pas si un troisième partenaire est nécessaire pour initier l'interaction. Si, comme cela est soupçonné pour les gènes TIR-NBS-LRR, la dimerisation ne se met en place que suite à la perception d'un effecteur du pathogène (Eitas et Dangl 2010), il serait préférable de privilégier un système d'étude d'interaction *in planta*, tel que la fluorescence par complémentarité bimoléculaire (BiFC). Dans ce système, deux fragments d'une même protéine fluorescente seraient fusionnés chacun à un gène TNL, et les deux gènes fusionnés aux deux fragments de la protéine fluorescente seraient introduits dans un génotype de pomme de terre par transformation génétique. Les racines des plantes régénérées seraient inoculées avec *G. pallida* et, si les protéines sont suffisamment proches pour interagir, une fluorescence sera observée autour du syncytium. Une éventuelle interaction, entre le gène codant une expansine (Spl\_Exp18430) et l'un ou l'autre des deux gènes TNL, pourrait également être testée par cette méthode.

## 6. Références Bibliographiques

- Aarts N, Metz M, Holub E, Staskawicz BJ, Daniels MJ, Parker JE (1998) Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10306-10311
- Aguinaldo AMA, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA (1997) Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387:489-493
- Aleshin VV, Kedrova OS, Milyutina IA, Vladychenskaya NS, Petrov NB (1998) Relationships among nematodes based on the analysis of 18S rRNA gene sequences: molecular evidence for monophyly of chromadorian and secernentian nematodes. *Russian J Nematology* 6:175-184
- Albrecht M, Takken FLW (2006) Update on the domain architectures of NLRs and R proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339:459-462
- Alkharouf NW, Klink VP, Chouikha IB, Beard HS, MacDonald MH, Meyer S, Knap HT, Khan R, Matthews BF (2006) Timecourse microarray analyses reveal global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Planta* 224:838-852
- Almagro L, Gomez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barcelo A, Pedreno MA (2009) Class III peroxidases in plant defense reactions. *J Exp Bot* 60:377-390
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Ammati M, Thomason IJ, Roberts PA (1985) Screening *Lycopersicon* spp. for new genes imparting resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Plant Dis* 69:112-115
- Ammiraju JSS, Veremis JC, Huang X, Roberts PA, Kaloshian I (2003) The heat-stable root-knot nematode resistance gene Mi-9 from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. *Theor Appl Genet* 106:478-484
- An SH, Choi HW, Hong JK, Hwang BK (2009) Regulation and function of the pepper pectin methylesterase inhibitor (CaPMEI1) gene promoter in defense and ethylene and methyl jasmonate signaling in plants. *Planta* 230:1223-1237
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64:5245-5250
- Andolfo G, Sanseverino W, Rombauts S, Van de Peer Y, Bradeen JM, Carputo D, Frusciante L, Ercolano MR (2013) Overview of tomato (*Solanum lycopersicum*) candidate pathogen recognition genes reveals important Solanum R locus dynamics. *New Phytol* 197:223-237
- Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, Kanamori H, Wu J, Matsumoto T, Ono K, Yano M (2008) Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer pikm-specific rice blast resistance. *Genetics* 180:2267-2276
- Axtell MJ, Chisholm ST, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (2003) Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol* 49:1537-46
- Ayliffe MA, Frost DV, Finnegan EJ, Lawrence GJ, Anderson PA, Ellis JG (1999) Analysis of alternative transcripts of the flax *L6* rust resistance gene. *Plant J* 17:287-292
- Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, Freialdenhoven A, Shirasu K, Schulze-Lefert P (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295:2073-2076

- Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, Takahashi A, Noel L, Sadanandom A, Casais C, Parker J, Shirasu K (2007) Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *Embo J* 25:2009-2016
- Bakker E, Butterbach P, Voort JRvd, Vossen Evd, Vliet Jv, Bakker J, Goverse A (2003) Genetic and physical mapping of homologues of the virus resistance gene *Rx1* and the cyst nematode resistance gene *Gpa2* in potato. *Theor Appl Genet* 106:1524-1531
- Bakker EG, Toomajian C, Kreitman M, Bergelson J (2006) A genomewide survey of R gene polymorphisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1803-1818
- Bar-Or C, Kapulnik Y and Koltai H (2005) A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Eur J Plant Pathol* 111:181-192
- Barcala M, Garcia A, Cubas P, Almoguera C, Jordano J, Fenoll C, Escobar C (2008) Distinct heat-shock element arrangements that mediate the heat shock, but not the late-embryogenesis induction of small heat-shock proteins, correlate with promoter activation in root-knot nematode feeding cells. *Plant Mol Biol* 66:151-164
- Barcala M, Garcia A, Cabrera J, Casson S, Lindsey K, Favery B, Garcia-Casado G, Solano R, Fenoll C, Escobar C (2010) Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *Plant J* 61:698-712
- Barone A, Ritter E, Schachtschabel U, Debener T, Salamini F, Gebhardt C (1990) Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Genet* 224:177-182
- Barthels N, van der Lee FM, Klap J, Goddijn OJM, Karimi M, Puzio P, Grundler FMW, Ohl SA, Lindsey K, Robertson L, Robertson WM, Van Montagua M, Gheysen G, Sijmons PC (1997) Regulatory sequences of arabidopsis drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell* 9:2119-2134
- Bendahmane A, Farnham G, Moffett P, Baulcombe DC (2002) Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *Plant J* 32:195-204
- Bernoux M, Ellis JG, Dodds PN (2011) New insights in plant immunity signaling activation. *Curr Opin Plant Biology* 14:512-518
- Bernoux M, Ve T, Williams S, Warren C, Hatters D, Valkov E, Zhang X, Ellis JG, Kobe B, Dodds PN (2011) Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation. *Cell Host & Microbe* 9:200-211
- Bert W, Karssen G, Helder J (2011) Phylogeny and Evolution of Nematodes. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Netherlands, pp 45-59
- Betka M, Grundler F, Wyss U (1991) Influence of changes in the nurse cell system (syncytium) on the development of the cyst nematode *Heterodera schachtii*-single-amino-acids. *Phytopathology* 81:75-79
- Bevan M (1984) A New *Agrobacterium* Vector for Plant Transformation. *Heredity* 53:577-578
- Bhattacharjee S, Halane MK, Kim SH and Gassmann W (2011) Pathogen effectors target *Arabidopsis* EDS1 and alter its interactions with immune regulators. *Science* 334:1405-1408
- Bhattarai KK, Li Q, Liu Y, Dinesh-Kumar SP, Kaloshian I (2007) The *Mi-1*-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. *Plant Physiol* 144:312-323

- Bhattarai KK, Xie QG, Mantelin S, Bishnoi U, Girke T, Navarre DA, Kaloshian I (2008) Tomato Susceptibility to Root-Knot Nematodes Requires an Intact Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Mol Plant Microbe Interact* 21:1205-1214
- Bird DM, Wilson MA (1994) DNA-sequence and expression analysis of root-knot nematode-elicited giant-cell transcripts. *Mol Plant Microbe Interact* 7:419-424
- Bird DM, Koltai H (2000) Plant parasitic nematodes: habitats, hormones, and horizontally acquired genes. *J Plant Growth Regul* 19:183-194
- Blanchard A, Fouville D, Esquibet M, Mugniery D, Grenier E (2007) Sequence polymorphism of 2 pioneer genes expressed in phytoparasitic nematodes showing different host ranges. *J Hered* 98:611-619
- Blanchard A (2007) Identification, polymorphisme et evolution moleculaire de gènes de pouvoir pathogène chez le nématode à kyste de la pomme de terre *Globodera pallida*. Thèse Université de Rennes 1. 230 p
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum *Nematoda*. *Nature* 392:71-75
- Boller T, Felix G (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu Rev Plant Biology* pp 379-406
- Bouzidi MF, Badaoui S, Cambon F, Vear F, De Labrouhe DT, Nicolas P, et al. (2002) Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor Appl Genet* 104:592-600
- Bradeen JM, Mann H, Quirin EA (2009) Resources for fast-forward R gene mapping and isolation in the genus *Solanum*. *Phytopathology* 99:S15-S15
- Bradshaw JE, Hackett CA, Meyer RC, Milbourne D, McNicol JW, Phillips MS, Waugh R (1998) Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 97:202-210
- Brown CR, Yang CP, Mojtahedi H, Santo GS, Masuelli R (1996) RFLP analysis of resistance to Columbia root-knot nematode derived from *Solanum bulbocastanum* in a BC2 population. *Theor Appl Genet* 92:572-576
- Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ, Manners JM (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiology* 132:1020-1032
- Bruguier L (2007) Développement et cartographie de marqueurs moléculaires utilisables pour la sélection de QTL et de gènes de résistance chez la pomme de terre. Master 2, Université Blas Pascal. 73 p
- Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Donaldson JK, Tarchini R, Valent B (2000) A single amino-acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2033-2046
- Bryan GJ, McLean K, Bradshaw JE, Jong WSd, Phillips M, Castelli L, Waugh R (2002) Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor Appl Genet* 105:68-77
- Bryan GJ, McLean K, Pande B, Purvis A, Hackett CA, Bradshaw JE, Waugh R (2004) Genetical dissection of *H3*-mediated polygenic PCN resistance in a heterozygous autotetraploid potato population. *Mol Breed* 14:105-116

- Burch-Smith TM, Schiff M, Caplan JL, Tsao J, Czymmek K, Dinesh-Kumar SP (2007) A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS Biol* 5:e68
- Bustin SA, Nolan T (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomolecular Techniques* 15:155-166
- C. elegans Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018
- Cai D, Kleine M, Kifle S, Harloff HJ, Sandal NN, Marcker KA, Klein-Lankhorst RM, Salentijn EMJ, Lange W, Stiekema WJ, Wyss U, Grundler FMW, Jung C (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275:832-834
- Caromel B, Gebhardt C (2011) Breeding for Nematode Resistance: Use of Genomic Information. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Netherlands, pp 465-492
- Caromel B, Mugniery D, Kerlan MC, Andrzejewski S, Palloix A, Ellisseche D, Rousselle-Bourgeois F, Lefebvre V (2005) Resistance quantitative trait loci originating from *Solanum sparsipilum* act independently on the sex ratio of *Globodera pallida* and together for developing a necrotic reaction. *Mol Plant Microbe Interact* 18:1186-1194
- Caromel B, Mugniery D, Lefebvre V, Andrzejewski S, Ellisseche D, Kerlan MC, Rousselle P, Rousselle-Bourgeois F (2003) Mapping QTLs for resistance against *Globodera pallida* (Stone) Pa2/3 in a diploid potato progeny originating from *Solanum spagazzinii*. *Theor Appl Genet* 106:1517-1523
- Caromel B, Aarouf J, Chauvin L, Kerlan MC, Lefebvre V, Speck A (2011) GpaV Gene Resistance to Nematodes in the Nighshade Family. WIPO patent application wo/2011/080329
- Castagnone-Sereno P, Bongiovanni M, Djian-Caporalino C (2001) New data on the specificity of the root-knot nematode resistance genes *Me1* and *Me3* in pepper. *Plant Breed* 120:429-433
- Castro-Quezada P, Aarouf J, Claverie M, Favery B, Mugniéry D, Lefebvre V, Caromel B (2013) Identification of Reference Genes for Normalizing RNA Expression in Potato Roots Infected with Cyst Nematodes. *Plant Mol Biol Rep* 1-10
- Casteel CL, Walling LL, Paine TD (2006) Behavior and biology of the tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*, in response to the Mi-1.2 gene. *Entomol Exp Appl* 121:67-72
- Catanzariti A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* 18:243-256
- Castelli L, Ramsay G, Bryan G, Neilson SJ, Phillips MS (2003) New sources of resistance to the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* in the Commonwealth Potato Collection. *Euphytica* 129:377-386
- Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C, Martin GB (2003) The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* 15:3033-3050
- Chao WS, Dogramaci M, Foley ME, Horvath DP, Anderson JV (2012) Selection and Validation of Endogenous Reference Genes for qRT-PCR Analysis in Leafy Spurge (*Euphorbia esula*). *Plos One* 7: e42839
- Chauvin L, Caromel B, Kerlan MC, Rulliat E, Fournet S, Chauvin JE, Grenier E, Ellissèche D, Mugniéry D (2008) La lutte contre les nématodes à kyste de la pomme de terre *Globodera rostochiensis* et *G. pallida*. *Cahiers Agricultures* 17:368-374
- Chen X, Shang J, Chen D, Lei C, Zou Y, Zhai W, et al. (2006) A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *Plant J* 46:794-804

- Chen RG, Li HX, Zhang LY, Zhang JH, Xiao JH, Ye ZB (2007) CaMi, a root-knot nematode resistance gene from hot pepper (*Capsium annuum* L.) confers nematode resistance in tomato. *Plant Cell Rep* 26:895-905
- Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, Loake GJ (2004) Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant J* 38:810-822
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814
- Choi JJ, Klosterman SJ, Hadwiger LA (2004) A promoter from pea gene DRR206 is suitable to regulate an elicitor-coding gene and develop disease resistance. *Phytopathology* 94:651-660
- Claverie M, Dirlewanger E, Bosselut N, Van Ghelder C, Voisin R, Kleinhentz M, Lafargue B, Abad P, Rosso MN, Chalhoub B, Esmenjaud D (2011) The *Ma* gene for complete-spectrum resistance to *Meloidogyne* species in *Prunus* is a TNL with a huge repeated C-terminal post-LRR region. *Plant Physiol* 156:779-792
- Cook DE, Lee TG, Guo XL, Melito S, Wang K, Bayless AM, Wang JP, Hughes TJ, Willis DK, Clemente TE, Diers BW, Jiang JM, Hudson ME, Bent AF (2012) Copy number variation of multiple genes at *Rhg1* mediates nematode resistance in soybean. *Science* 338:1206-1209
- Dalzell JJ, McMaster S, Johnston MJ, Kerr R, Fleming CC, Maule AG (2009) Non-nematode-derived double-stranded RNAs induce profound phenotypic changes in *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida* infective juveniles. *Int J Parasit* 39:1503-1516
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833
- Davis EL, Hussey RS, Baum TJ, Bakker J, Schots A, Rosso M-N, Abad P (2000) Nematode parasitism genes. *Annu Rev Phytopathol* 38:365-396
- De Almeida-Engler J, Van Poucke K, Karimi M, De Groot R, Gheysen G, Engler G, Gheysen G (2004) Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant J* 38:12-26
- De Boer JM, McDermott JP, Wang XH, Maier T, Qu F, Hussey RS, Davis EL, Baum TJ (2002) The use of DNA microarrays for the developmental expression analysis of cDNAs from the oesophageal gland cell region of *Heterodera glycines*. *Mol Plant Pathol* 3:261-270
- de Deus Barbosa AEA, da Rocha Fragoso R, Lima de Souza DdS, Freirer E, de Oliveira Neto OB, Viana AAB, Togada RC, Guimares LMO, Martins NIF, Cia E, Fernandez D, de Lima LM, Silva MCM, Rocha TL, Grossi-de-Sa MF (2009) Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. *Plant Sci* 177:492-497
- de Ilarduya OM, Kaloshian I (2001) Mi-1.2 transcripts accumulate ubiquitously in resistant *Lycopersicon esculentum*. *J Nematol* 33:116-120
- De Ley P, Blaxter ML (2002) Systematic position and phylogeny. In: Lee DL (ed) *The biology of nematodes*. Taylor & Francis, London
- De Meutter J, Vanholme B, Bawn G, Tytgat T, Gheysen G (2001) Preparation and sequencing of secreted proteins from the pharyngeal glands of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Mol Plant Pathol* 2:297-301
- De Meutter J, Tytgat T, Witters E, Gheysen G, Van Onckelen H (2003) Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Mol Plant Pathol* 4:271-277
- De Meutter J, Robertson L, Parcy F, Mena M, Fenoll C, Gheysen G (2005) Differential activation of *ABI3* and *LEA* genes upon plant parasitic nematode infection. *Mol Plant Pathol* 6:321-325

- Deliopoulos T, Haydock PPJ, Jones PW (2008) Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and the nematicide aldicarb on hatch and development of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and yield of potatoes. *Nematology* 10:783-799
- Dellaert LMW, Hoekstra R (1987) Resistance of potato cyst nematodes, *Globodera* spp., in wild and primitive *Solanum* species. *Potato Res* 30:579-587
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2404-2409
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich L, Genin S, Marco Y (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8024-8029
- Deslandes L, Rivas S (2011) The plant cell nucleus: a true arena for the fight between plants and pathogens. *Plant Signal Behav* 6:42-48
- Diaz-De-Leon F, Klotz KL, Lagrimini LM (1993) Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. *Plant Physiology* 101:1117-1118
- Dinesh-Kumar SP, Baker BJ (2000) Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1908-1913
- Djian-Caporalino C, Fazari A, Arguel MJ, Vernie T, VandeCastele C, Faure I, Brunoud G, Pijarowski L, Palloix A, Lefebvre V, Abad P (2007) Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor Appl Genet* 114: 473-486
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA and Ellis JG (2004) The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16:755-768
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CIA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8888-8893
- Dropkin VH (1969) Cellular responses of plants to nematode infections. *Ann Rev Phytopathol* 7:101-122
- Dubreuil G, Magliano M, Deleury E, Abad P, Rosso MN (2007) Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytol* 176:426-436
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sorensen MV, Haddock SHD, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G (2008) Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452:745-U745
- Eitas TK, Nimchuk ZL, Dangl JL (2008) Arabidopsis TAO1 is a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance induced by the *Pseudomonas syringae* effector AvrB (vol 105, pg 6475, 2008). *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15219-15219
- Eitas TK, Dangl JL (2010) NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. *Curr Opin Plant Biol* 13:472-477
- Ellenby C (1954) Tuber-forming species and varieties of the genus *Solanum* tested for resistance to the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenberg. *Euphytica* 3:195-202



- Elling AA, Mitreva M, Gai XW, Martin J, Recknor J, Davis EL, Hussey RS, Nettleton D, McCarter JP, Baum TJ (2009) Sequence mining and transcript profiling to explore cyst nematode parasitism. *Bmc Genomics* 10
- Ellis JG, Lawrence GJ, Luck JE, Dodds PN (1999) Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. *Plant Cell* 11:495-506
- Ellis J, Dodds P, Pryor T (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 3:278-284
- Ellis JG, Dodds PN, Lawrence GJ (2007) The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi. *Curr Opin Microbiology* 10: 326-331
- Ernst K, Kumar A, Kriseleit D, Kloos DU, Phillips MS, Ganai MW (2002) The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. *Plant J* 31:127-136
- Escobar C, De Meutter J, Aristizabal FA, Sanz-Alferez S, del Campo FF, Barthels N, Van der Eycken W, Seurinck J, van Montagu M, Gheysen G, Fenoll C (1999) Isolation of the *LEMMI9* gene and promoter analysis during a compatible plant-nematode interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 12:440-449
- Escobar C, Barcala M, Portillo M, Almoguera C, Jordano J, Fenoll C (2003) Induction of the *Hahsp17.7G4* promoter by root-knot nematodes: Involvement of heat-shock elements in promoter activity in giant cells. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1062-1068
- Escobar C, Brown S, Mitchum M (2011) Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Plant Response to Nematode Infection. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Netherlands pp 157-173
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo J* 18:4689-4699
- Evans K, Franco J, de Scurrah M (1975) Distribution of species of potato cyst nematodes in South America. *Nematologica* 21:365-369
- Faigon-Soverna A, Harmon FG, Storani L, Karayekov E, Staneloni RJ, Gassmann W, et al. (2006) A constitutive shade-avoidance mutant implicates TIR-NBS-LRR proteins in *Arabidopsis* photomorphogenic development. *Plant Cell* 18:2919-2928
- Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JDG, Daniels MJ and Parker JE (1999) *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3292-3297
- Favery B, Lecomte P, Gil N, Bechtold N, Bouchez D, Dalmaso A, Abad P (1998) *RPE*, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *Embo J* 17:6799-6811
- Feys BJ, Moisan LJ, Newman MA and Parker JE (2001) Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, *EDS1* and *PAD4*. *Embo J* 20:5400-5411
- Finkers-Tomczak A (2011) Co-evolution between *Globodera rostochiensis* and potato driving sequence diversity of NB-LRR resistance loci and nematode suppressors of plant immunity. Wageningen University. 200 p
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811
- Flor (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Ann Rev Phytopathol* 9:275-296
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer JA (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408:325-330

- Fudali S, Janakowski S, Sobczak M, Griesser M, Grundler FMW, Golinowski W (2008) Two tomato alpha-expansins show distinct spatial and temporal expression patterns during development of nematode-induced syncytia. *Physiologia Plantarum* 132:370-383
- Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* 13:207-209
- Ganal MW, Simon R, Brommonschenkel S, Arndt M, Phillips MS, Tanksley SD, Kumar A (1995) Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (*Hero*) against *Globodera rostochiensis* in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 8:886-891
- Gal TZ, Aussenberg ER, Burdman S, Kapulnik Y, Koltai H (2006) Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism on tomato. *Planta* 224:155-162
- Gao BL, Allen R, Maier T, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2001) Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1247-1254
- Gao BL, Allen R, Maier T, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2003) The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:720-726
- Gao F, Shu X, Ali MB, Howard S, Li N, Winterhagen P, Qiu W and Gassmann W (2010) A functional *EDS1* ortholog is differentially regulated in powdery mildew-resistant and -susceptible grapevines and complements an *Arabidopsis eds1* mutant. *Planta* 231:1037-1047
- Gao Z, Chung EH, Eitas TK, Dangl JL (2011) Plant intracellular innate immune receptor Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1 (RPM1) is activated at, and functions on, the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:7619-7624
- Garcia AV, Parker JE (2009) Heaven's Gate: nuclear accessibility and activities of plant immune regulators. *Trends Plant Sci* 14:479-487
- Garcia AV, Blanvillain-Baufume S, Huibers RP, Wiermer M, Li G, Gobbato E, Rietz S, Parker JE (2010) Balanced nuclear and cytoplasmic activities of EDS1 are required for a complete plant innate immune response. *PLoS Pathog*, 6:e1000970
- Gassmann W, Bhattacharjee S (2012) Effector-Triggered Immunity Signaling: From Gene-for-Gene Pathways to Protein-Protein Interaction Networks. *Mol Plant Microbe Interact* 25:862-868
- Gebhardt C, Mugniéry D, Ritter E, Salamini F, Bonnel E (1993) Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor Appl Genet* 85:541-544
- Germain H, Lachance D, Pelletier G, Fossdal CG, Solheim H, Seguin A (2012) The expression pattern of the *Picea glauca* Defensin 1 promoter is maintained in *Arabidopsis thaliana*, indicating the conservation of signalling pathways between angiosperms and gymnosperms. *J Experimental Botany* 63:785-795
- Gheysen G, Fenoll C (2002) Gene expression in nematode feeding sites. *Annu Rev Phytopathol* 40:191-219
- Gheysen G, Mitchum M (2009) Molecular Insights in the Susceptible Plant Response to Nematode Infection. *Cell Biology of Plant Nematode Parasitism*. In: Berg R, Taylor C (eds). Springer Berlin / Heidelberg, pp 45-81
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 43:205-227
- Gleason CA, Liu QL, Williamson VM (2008) Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene *Mi-1* leads to acquisition of virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 21:576-585

- Goddijn OJM, Lindsey K, Vanderlee FM, Klap JC, Sijmons PC (1993) Differential gene-expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter GUS-fusion constructs. *Plant J* 4:863-873
- Goellner M, Wang XH, Davis EL (2001) *Endo-beta-1,4-glucanase* expression in compatible plant-nematode interactions. *Plant Cell* 13:2241-2255
- Goggin FL, Shah G, Williamson VM, Ullman DE (2004) Instability of Mi-mediated nematode resistance in transgenic tomato plants. *Mol Breed* 13:357-364
- Golinowski W, Grundler FMW, Sobczak M (1996) Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194:103-116
- Goulao LF, Fortunato AS, Ramalho JC (2012) Selection of Reference Genes for Normalizing Quantitative Real-Time PCR Gene Expression Data with Multiple Variables in *Coffea* spp. *Plant Mol Biol Rep* 30:741-759
- Goverse A, Biesheuvel J, Wijers GJ, Gommers FJ, Bakker J, Schots A, Helder J (1998) In planta monitoring of the activity of two constitutive promoters, CaMV 35S and TR2', in developing feeding cells induced by *Globodera rostochiensis* using green fluorescent protein in combination with confocal laser scanning microscopy. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52:275-284
- Goverse A, Overmars H, Engelbertink J, Schots A, Bakker J, Helder J (2000) Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:1121-1129
- Goverse A, Bird D (2011) The Role of Plant Hormones in Nematode Feeding Cell Formation. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Netherlands, pp 325-347
- Griesser M, Grundler FMW (2008) Quantification of tomato expansins in nematode feeding sites of cyst and root-knot nematodes. *J Plant Diseases and Protection* 115:263-272
- Grover A (2012) Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31:57-73
- Grubisic D, Culjak TG, Jelovcan S (2008) Non-Chemical Control - Effective and of Ecologically Acceptable Approach of Potato Cyst Nematode Control. *Cereal Res Commun* 36:23-26
- Grundler F, Schnibbe L, Wyss U (1991) In vitro studies on the behaviour of second-stage juveniles of *Heterodera schachtii* (*Nematoda: Heteroderidae*) in response to host plant root exudates. *Parasitology* 103:149-155
- Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 60:487-493
- Guo S and Kemphues K (1995) Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81:611-620
- Guo JL, Xu LP, Fang JP, Su YC, Fu HY, Que YX, Xu JS (2012) A novel dirigent protein gene with highly stem-specific expression from sugarcane, response to drought, salt and oxidative stresses. *Plant Cell Rep* 31:1801-1812
- Gupta N, Gupta AK, Singh NK, Kumar A (2011) Differential Expression of PBF Dof Transcription Factor in Different Tissues of Three Finger Millet Genotypes Differing in Seed Protein Content and Color. *Plant Mol Biol Rep* 29:69-76
- Gurr SJ, McPherson MJ, Scollan C, Atkinson HJ, Bowles DJ (1991) Gene-expression in nematode-infected plant-roots. *Molecular & General Genetics* 226:361-366

- Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, Bellini C, van Wuytswinkel O (2008) Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *Plant Cell* 20:1734-1735
- Haegeman A, Vanholme B, Gheysen G (2009) Characterization of a putative endoxylanase in the migratory plant-parasitic nematode *Radopholus similis*. *Mol Plant Pathol* 10:389-401
- Haegeman A, Joseph S, Gheysen G (2011) Analysis of the transcriptome of the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae* generated by 454 sequencing technology. *Mol Biochem Parasitol* 178:7-14
- Haegeman A, Mantelin S, Jones JT, Gheysen G (2012) Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* 492:19-31
- Halterman DA, Wei FS, Wise RP (2003) Powdery mildew-induced Mla mRNAs are alternatively spliced and contain multiple upstream open reading frames. *Plant Physiol* 131:558-567
- Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001) Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Gen* 2:110-119
- Heidrich K, Wirthmueller L, Tasset C, Pouzet C, Deslandes L and Parker JE (2011) *Arabidopsis* EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science* 334:1401-1404
- Hermesmeier D, Mazarei M, Baum TJ (1998) Differential display analysis of the early compatible interaction between soybean and the soybean cyst nematode. *Mol Plant Microbe Interact* 11:1258-1263
- Hewezi T, Mouzeyar S, Thion L, Rickauer M, Alibert G, Nicolas P, et al. (2006) Antisense expression of a NBS-LRR sequence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): evidence for a dual role in plant development and fungal resistance. *Transgenic Res* 15:165-180
- Hewezi T, Baum TJ (2012) Manipulation of Plant Cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors. *Mol Plant Microbe Interact* 26:9-16
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Higo H (1998) PLACE: a database of plant cis-acting regulatory DNA elements. *Nucleic Acids Res* 26:358-359
- Hofmann J, Grundler FMW (2007) Identification of reference genes for qRT-PCR studies of gene expression in giant cells and syncytia induced in *Arabidopsis thaliana* by *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Nematology* 9:317-323
- Holt BF 3rd, Belkhadir Y, Dangl JL (2005) Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science* 309:929-932
- Holterman M, van der Wurff A, van den Elsen S, van Megen H, Bongers T, Holovachov O, Bakker J, Helder J (2006) Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Mol Biol and Evolution* 23:1792-1800
- Hong JK, Hwang BK (2006) Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, CAC<sub>hi</sub>2, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the CAC<sub>hi</sub>2-overexpressing *Arabidopsis*. *Planta* 223:433-448
- Hur JY, Choi E, Buckley KJ, Lee S, Davis KR (2008) Identification of a promoter motif involved in Curtovirus sense-gene expression in transgenic *Arabidopsis*. *Mol Cells* 26:131-139
- Howles P, Lawrence G, Finnegan J, McFadden H, Ayliffe M, Dodds P, Ellis J (2005) Autoactive alleles of the flax *L6* rust resistance gene induce non-race-specific rust resistance associated with the hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* 18:570-582
- Hruz T, Wyss M, Docquier M, Pfaffl MW, Masanetz S, Borghi L, Verbrugghe P, Kalaydjieva L, Bleuler S, Laule O, Descombes P, Gruissem W, Zimmermann P (2011) RefGenes: identification

- of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BMC Genomics* 12:DOI: 10.1186/1471-2164-1112-1156
- Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, Tseng PH, Mariathasan S, Humke EW, Eckmann L, Powell JJ, Nizet V, Dixit VM, Karin M (2008) ANOD2–NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7803-7808
- Hu GS, deHart AKA, Li YS, Ustach C, Handley V, Navarre R, Hwang CF, Aegerter BJ, Williamson VM and Baker B (2005) *EDS1* in tomato is required for resistance mediated by TIR-class *R* genes and the receptor-like *R* gene *Ve*. *Plant J* 42:376-391
- Huang GZ, Gao BL, Maier T, Allen R, Davis EL, Baum TJ, Hussey RS (2003) A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:376-381
- Hubert DA, He Y, McNulty BC, Tornero P, Dangl JL (2009) Specific Arabidopsis HSP90.2 alleles recapitulate RAR1 cochaperone function in plant NB-LRR disease resistance protein regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9556-9563
- Hutangura P, Mathesius U, Jones MGK and Rolfe BG (1999) Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by rootknot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Aust J Plant Physiol* 26:221-231
- Hwang CF, Bhakta AV, Truesdell GM, Pudlo WM, Williamson VM (2000) Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. *Plant Cell* 12:1319-1329
- Inigo S, Giraldez AN, Chory J, Cerdan PD (2012) Proteasome-Mediated Turnover of Arabidopsis MED25 Is Coupled to the Activation of FLOWERING LOCUS T Transcription. *Plant Physiology* 160:1662-1673
- Ithal N, Recknor J, Nettleton D, Hearne L, Maier T, Baum TJ, Mitchum MG (2007a) Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 20:293-305
- Ithal N, Recknor J, Nettleton D, Maier T, Baum TJ, Mitchum MG (2007b) Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol Plant Microbe Interact* 20:510-525
- Itzhaki H, Woodson WR (1993) Characterization of an ethylene-responsive glutathione S-transferase gene cluster in carnation. *Plant Mol Biol* 22:43-58
- Jacobs JME, van Eck HJ, Horsman K, Arens PFP, Verkerk-Bakker B, Jacobsen E, Pereira A, Stiekema WJ (1996) Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. *Mol Breed* 2:51-60
- Jacobs MMJ, van den Berg RG, Vleeshouwers V, Visser M, Mank R, Sengers M, Hoekstra R, Vosman B (2008) AFLP analysis reveals a lack of phylogenetic structure within *Solanum* section *Petota*. *Bmc Evolutionary Biology* 8
- Jacquet M, Bongiovanni M, Martinez M, Verschave P, Wajnberg E, Castagnone-Sereno P (2005) Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathol* 54:93-99
- Jammes F, Lecomte P, Almeida-Engler J, Bitton F, Martin-Magniette ML, Renou JP, Abad P, Favery B (2005) Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J* 44:447-458

- Jaubert S, Laffaire JB, Abad P, Rosso MN (2002) A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. FEBS Lett. 522:109-112
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. Embo J 19:4004-4014
- Jolivet K, Grenier E, Bouchet JP, Esquibet M, Kerlan MC, Caromel B, Mugniery D, Lefebvre V (2007) Identification of plant genes regulated in resistant potato *Solanum sparsipilum* during the early stages of infection by *Globodera pallida*. Genome 50:422-427
- Jones MGK, Northcot.Dh (1972) Nematode-Induced Syncytium - Multinucleate Transfer Cell. J Cell Science 10:789-&
- Jones JT, Furlanetto C, Bakker E, Banks B, Blok VC et al (2003) Characterization of a chorismate mutase from the potato cyst nematode *Globodera pallida*. Mol Plant Pathol 4:43-50
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444:323-329
- Jones JT, Kumar A, Pylypenko LA, Thirugnanasambandam A, Castelli L, Chapman S, Cock PJA, Grenier E, Lilley CJ, Phillips MS, Blok VC (2009) Identification and functional characterization of effectors in expressed sequence tags from various life cycle stages of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. Mol Plant Pathol 10:815-828
- Jones L, Giorgi C, Urwin P (2011) *C. elegans* as a Resource for Studies on Plant Parasitic Nematodes. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer Netherlands, pp 175-220
- Juergensen K, Scholz-Starke J, Sauer N, Hess P, van Bel AJE, Grundler FMW (2003) The companion cell-specific *Arabidopsis* disaccharide carrier AtSUC2 is expressed in nematode-induced syncytia. Plant Physiol 131:61-69
- Kaloshian I, Williamson VM, Miyao G, Lawn DA, Westerdahl BB (1996) « Resistance-breaking » nematodes identified in California tomatoes. Calif Agric 50:18-19
- Kaloshian I, Desmond O, Atamian H (2011) Disease Resistance-Genes and Defense Responses During Incompatible Interactions. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer Netherlands, pp 309-324
- Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature 421:231-237
- Kobe B and Deisenhofer J (1994) The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. Trends Biochemical Sci 19:415-421
- Karczmarek A, Fudali S, Lichoocka M, Sobczak M, Kurek W, Janakowski S, Roosien J, Golinowski W, Bakker J, Goverse A, Helder J (2008) Expression of two functionally distinct plant endo-beta-1,4-glucanases is essential for the compatible interaction between potato cyst nematode and its hosts. Mol Plant Microbe Interact 21:791-798
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. Trends Plant Sci 7:193-195
- Khan R, Alkharouf N, Beard H, MacDonald M, Chouikha I, Meyer S, Grefenstette J, Knap H, Matthews B (2004) Microarray analysis of gene expression in soybean roots susceptible to the soybean cyst nematode two days post invasion. J Nematol 36:241-248
- Kikuchi T, Aikawa T, Kosaka H, Pritchard L, Ogura N, Jones JT (2007) Expressed sequence tag (EST) analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *B-mucronatus*. Mol Biochem Parasitol 155:9-17

- Klein-Lankhorst R, Rietveld P, Machiels B, Verkerk R, Weide R, Gebhardt C, Koornneef M, Zabel P (1991) RFLP markers linked to the root-knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor Appl Genet* 81:661-667
- Klink VP, Alkharouf N, MacDonald M, Matthews B (2005) Laser capture microdissection (LCM) and expression analyses of *Glycine max* (soybean) syncytium containing root regions formed by the plant pathogen *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Mol Biol* 59:965-979
- Klink VP, Overall CC, Alkharouf NW, MacDonald MH, Matthews BF (2007a) A time-course comparative microarray analysis of an incompatible and compatible response by *Glycine max* (soybean) to *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode) infection. *Planta* 226: 1423-1447
- Klink VP, Overall CC, Alkharouf NW, MacDonald MH, Matthews BF (2007b) Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (*Glycine max*) roots infected by the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Planta* 226:1389-1409
- Klink VP, Hosseini P, Matsye P, Alkharouf NW, Matthews BF (2009) A gene expression analysis of syncytia laser microdissected from the roots of the *Glycine max* (soybean) genotype PI 548402 (Peking) undergoing a resistant reaction after infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Plant Mol Biol* 71:525-567
- Kouassi AB, Kerlan MC, Caromel B, Dantec JP, Fouville D, Manzanares-Dauleux M, Ellisseeche D, Mugniery D (2006) A major gene mapped on chromosome XII is the main factor of a quantitatively inherited resistance to *Meloidogyne fallax* in *Solanum sparsipilum*. *Theor Appl Genet* 112:699-707
- Kreike CM, de Koning JRA, Vinke JH, van Ooijen JW, Gebhardt C, Stiekema W (1993) Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. *Theor Appl Genet* 87:464-470
- Kreike CM, de Koning JRA, Vinke JH, van Ooijen JW, Stiekema WJ (1994) Quantitatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spegazzinii*. *Theor Appl Genet* 88:764-769
- Lambert KN, Ferrie BJ, Nombela G, Brenner ED, Williamson VM (1999) Identification of genes whose transcripts accumulate rapidly in tomato after root-knot nematode infection. *Physiol. Mol Plant Pathol* 55:341-348
- Lee SC, Hwang BK (2006) Identification and deletion analysis of the promoter of the pepper SAR8.2 gene activated by bacterial infection and abiotic stresses. *Planta* 224:255-267
- Lee SK, Song MY, Seo YS, Kim HK, Ko S, Cao PJ, Suh JP, Yi G, Roh JH, Lee S et al. (2009) Rice Pi5-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two CC-NB-LRR genes. *Genetics* :1627-1638
- Lee SC (2011) Promoter analysis of the pepper antimicrobial protein gene, CaAMP1, during bacterial infection and abiotic stress. *Eur J Plant Pathol* 129:609-620
- Leister RT, Dahlbeck D, Day B, Li Y, Chesnokova O, Staskawicz BJ (2005) Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 17:1268-1278
- Leone A, Melillo MT, Bleve-Zacheo T (2001) Lipoxygenase in pea roots subjected to biotic stress. *Plant Sci* 161:703-717
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 30:325-327

- Liu Y, Schiff M, Serino G, Deng XW, Dinesh-Kumar SP (2002) Role of SCF Ubiquitin-Ligase and the COP9 Signalosome in the *N* Gene-Mediated Resistance Response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* 14:1483-1496
- Liu SM, Kandath PK, Warren SD, Yeckel G, Heinz R, Alden J, Yang CL, Jamai A, El-Mellouki T, Juvele PS, Hill J, Baum TJ, Cianzio S, Whitham SA, Korkin D, Mitchum MG, Meksem K (2012) A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature* 492:256
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165-178
- Loutre C, Wicker T, Travella S, Galli P, Scofield S, Fahima T, Feuillet C, Keller B (2009) Two different CC-NBS-LRR genes are required for *Lr10*-mediated leaf rust resistance in tetraploid and hexaploid wheat. *Plant J* 60:1043-1054
- Lozano-Torres JL, Wilbers RHP, Gawronski P, Boshoven JC, Finkers-Tomczak A, Cordewener JHG, America AHP, Overmars HA, Van 't Klooster JW, Baranowski L, Sobczak M, Ilyas M, van der Hoorn RAL, Schots A, de Wit P, Bakker J, Goverse A, Smant G (2012) Dual disease resistance mediated by the immune receptor *Cf-2* in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:10119-10124
- Lu SW, Chen S, Wang J, Yu H, Chronis D et al (2009) Structural and functional diversity of CLAVATA3/ESR (CLE)-Like genes from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant Microbe Interact* 22:1128-1142
- Lukasik E, Takken FLW (2009) STANDING strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12:427-436
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-754
- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR and Dangl JL (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112:379-389
- Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A (2001) Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 11:171-176
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW (2006) Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. *Genome Biology* 7:212
- Maekawa T, Cheng W, Spiridon LN, Toller A, Lukasik E, Saijo Y, Liu PY, Shen QH, Micluta MA, Somssich IE, Takken FLW, Petrescu AJ, Chai JJ, Schulze-Lefert P (2011) Coiled-Coil Domain-Dependent Homodimerization of Intracellular Barley Immune Receptors Defines a Minimal Functional Module for Triggering Cell Death. *Cell Host & Microbe* 9:187-199
- Mazarei M, Lennon KA, Puthoff DP, Rodermel SR, Baum TJ (2003) Expression of an Arabidopsis phosphoglycerate mutase homologue is localized to apical meristems, regulated by hormones, and induced by sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Mol Biol* 53:513-530
- Mazarei M, Lennon KA, Puthoff DP, Rodermel SR, Baum TJ (2004) Homologous soybean and Arabidopsis genes share responsiveness to cyst nematode infection. *Mol Plant Pathol* 5:409-423
- McCarter JP, Mitreva MD, Martin J, Dante M, Wylie T, Rao U, Pape D, Bowers Y, Theising B, Murphy CV, Kloek AP, Chiapelli BJ, Clifton SW, Bird DM, Waterston RH (2003) Analysis and functional classification of transcripts from the nematode *Meloidogyne incognita*. *Genome Biology* 4



- Meier I, Somers DE (2011) Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants. *Curr Opin Plant Biol* doi:10.1016/j.pbi.06.005
- Mekete T, Hallmann J, Kiewnick S, Sikora R (2009) Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonise *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 11:117-127
- Mello CC and Conte Jr D (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431:338-342
- Messeguer R, Ganal M, de Vicente MC, Young ND, Bolkan H, Tanksley SD (1991) High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theor Appl Genet* 82:529-536
- Mestre P, Baulcombe DC (2006) Elicitor-mediated oligomerization of the tobacco N disease resistance protein. *Plant Cell* 18:491-501
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J* 20:317-332
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319
- Mitreva M, Elling AA, Dante M, Kloek AP, Kalyanaraman A, Aluru S, Clifton SW, Bird DM, Baum TJ, McCarter JP (2004) A survey of SL1-spliced transcripts from the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. *Molecular Genetics and Genomics* 272:138-148
- Moffett P, Farnham G, Peart J, Baulcombe DC (2002) Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *Embo J* 21:4511-4519
- Moloney C, Griffin D, Jones PW, Bryan GJ, Karen McLean K, John E. Bradshaw JE, Milbourne D (2010) Development of diagnostic markers for use in breeding potatoes resistant to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3 using germplasm derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 2802. *Theor Appl Genet* 120:679-689
- Moreau M, Degrave A, Vedel R, Bitton F, Patrit O, Renou JP, Barny MA, Fagard M (2012) EDS1 Contributes to Nonhost Resistance of *Arabidopsis thaliana* Against *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 25:421-430
- Mucyn TS, Clemente A, Andriotis VME, Balmuth AL, Oldroyd GED, Staskawicz BJ, Rathjen JP (2006) The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *Plant Cell* 18:2792-2806
- Mugniéry D, Person F (1976) Methode d'élevage de quelques espèces de nématodes à kyste du genre *Heterodera*. *Sciences agronomiques Rennes*: 217-220
- Mugniéry D (1996) Nématodes. In: Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC (eds) *La pomme de terre*. INRA Editions (Paris), pp 164-171
- Mugniéry D, Phillips MS, Rumpfenhorst HJ, Stone AR, Treur A, Trudgill DL (1989) Assesment of partial resistance of potato to, and pathotype and virulence differences in potato cyst nematodes. *Bull OEPP* 19:7-25
- Mugniéry D, Fouville D, Dantec JP, Pellé R, Rousselle-Bourgeois F, Ellissèche D (2001) Résistance à *Globodera pallida* Pa2/3 chez *Solanum sparsipilum*. *Nematology* 3:619-626
- Mukhtar MS, Nishimura MT, Dangl J (2009) NPR1 in Plant Defense: It's Not over 'til It's Turned over. *Cell* 137:804-806
- Narusaka M, Kubo Y, Shiraiishi T, Iwabuchi M, Narusaka Y (2009) A dual resistance gene system prevents infection by three distinct pathogens. *Plant Signalling & Behaviour* 4(10):954-955

- Narusaka M, Shirasu K, Noutoshi Y, Kubo Y, Shiraishi T, Iwabuchi M, Narusaka Y (2009) *RRS1* and *RPS4* provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J*:218-226
- Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, Nijs Ld, Hockland S, Maafi ZT (2011) Current Nematode Threats to World Agriculture. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Netherlands, pp 21-43
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56:2907-2914
- Niebel A, Engler JD, Tire C, Engler G, Vanmontagu M, Gheysen G (1993) Induction-patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. *Plant Cell* 5:1697-1710
- Niebel A, Engler JD, Hemerly A, Ferreira P, Inze D, VanMontagu M, Gheysen G (1996) Induction of *cdc2a* and *cyc1At* expression in *Arabidopsis thaliana* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. *Plant J* 10:1037-1043
- Nombela G, Williamson VM, Muniz M (2003) The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:645-649
- Nurnberger T, Kemmerling B (2006) Receptor protein kinases - pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci* 11:519-522
- Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H (2000) Three ethylenesponsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *Plant J* 22:29-38
- Onate-Sanchez L, Singh KB (2002) Identification of *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol* 128:1313-1322
- Oh Cs and Martin G (2011) Tomato 14-3-3 Protein TFT7 Interacts with a MAP Kinase Kinase to Regulate Immunity-associated Programmed Cell Death Mediated by Diverse Disease Resistance Proteins. *J Biol Chem* 286:14129-14136
- Ovesna J, Kucera L, Vaculova K, Strymplova K, Svobodova I, Milella L (2012) Validation of the beta-amy1 Transcription Profiling Assay and Selection of Reference Genes Suited for a RT-qPCR Assay in Developing Barley Caryopsis. *Plos One* 7: e41886
- Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menendez CM, Salamini F, Ballvora A, Gebhardt C (2004) Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J* 38:285-297
- Padmanabhan M, Cournoyer P and Dinesh-Kuma SP (2009) The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular Microbiology* 11(2):191-198
- Parker JE, Holub EB, Frost LN, Falk A, Gunn ND, Daniels MJ (1996) Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* 8:2033-2046
- Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ (2004) Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol* 135:2150-2161
- Pastuglia M, Roby D, Dumas C, Cock JM (1997) Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* 9:49-60

- Patikoglou GA, Kim JL, Sun L, Yang SH, Kodadek T, Burley SK (1999) TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev* 13(24):3217-3230
- Peart JR, Lu R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice DC, Schauser L, Jaggard DAW, Xiao SY, Coleman MJ, Dow M, Jones JDG, Shirasu K, Baulcombe DC (2002) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10865-10869
- Peart JR, Mestre P, Lu R, Malcuit I, Baulcombe DC (2005) NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against tobacco mosaic virus. *Curr Biol* 15:968-973
- Pedley KF, Martin GB (2003) Molecular basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Ann Rev Phytopathol* 41:215-243
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acids Res* 30: e36
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26:509-515
- Picard D, Plantard O, Scurrah M, Mugniery D (2004) Inbreeding and population structure of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) in its native area (Peru). *Mol Ecol* 13:2899-2908
- Picard D, Plantard O (2006) What constitutes a population for the plant parasitic nematode *Globodera pallida* in its native area (Peru)? *International J Parasitology* 36:115-122
- Pineda O, Bonierbale MW, Plaisted RL, Brodie BB, Tanksley SD (1993) Identification of RFLP markers linked to the *H1* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Genome* 36:152-156
- Popeijus M, Blok VC, Cardle L, Bakker E, Phillips MS, Helder J, Smant G, Jones JT (2000) Analysis of genes expressed in second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G-pallida* using the expressed sequence tag approach. *Nematology* 2:567-574
- Postel S, Kemmerling B (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:1025-1031
- Puthoff DP, Nettleton D, Rodermel SR, Baum TJ (2003) Arabidopsis gene expression changes during cyst nematode parasitism revealed by statistical analyses of microarray expression profiles. *Plant J* 33:911-921
- Puzio PS, Grundler FMW (2000) Isolation and application of nematode induced promoters, genes and proteins from *Arabidopsis thaliana* related to nematode feeding structures. *Gene* 239:163-172
- Qi JN, Yu SC, Zhang FL, Shen XQ, Zhao XY, Yu YJ, Zhang DS (2010) Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction of mRNA Transcript Levels in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*). *Plant Mol Biol Rep* 28:597-604
- Qin L, Overmars B, Helder J, Popeijus H, van der Voort JR, Groenink W, van Koert P, Schots A, Bakker J, Smant G (2000) An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant Microbe Interact* 13:830-836
- Radivojevic M (2009) Biological control of potato cyst nematodes using plants *Biolosko suzbijanje krompirovih cistolikih nematoda pomocu biljaka*. *Biljni Lekar (Plant Doctor)* 37

- Rahimi S, Wright DJ, Perry RN (1998) Identification and localisation of chitinases induced in the roots of potato plants infected with the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Fundam appl Nematol* 21:705-713
- Rairdan G, Moffett P (2007) Brothers in arms? Common and contrasting themes in pathogen perception by plant NB-LRR and animal NACHT-LRR proteins. *Microbes and Infection* 9:677-686
- Rairdan GJ, Moffett P (2006) Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. *Plant Cell* 18:2082-2093
- Ramsay K, Jones MGK, Wang ZH (2006) Laser capture microdissection: a novel approach to microanalysis of plant-microbe interactions. *Mol Plant Pathol* 7:429-435
- Raski DJ (1950) The life history and morphology of the sugar-beet nematode, *Heterodera schantii* Schmidt. *Phytopathology* 40:135-152
- Rehman S, Postma W, Tytgat T, Prins P, Qin L, Overmars H, Vossen J, Spiridon LN, Petrescu AJ, Govers A, Bakker J, Smant G (2009) A Secreted SPRY Domain-Containing Protein (SPRYSEC) from the Plant-Parasitic Nematode *Globodera rostochiensis* Interacts with a CC-NB-LRR Protein from a Susceptible Tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 22:330-340
- Rice SL, Leadbeater BSC, Stone AR (1985) Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. I. Potatoes with resistance gene *HI* derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Physiol Plant Pathol* 27:219-234
- Rivas S, Thomas CM (2005) Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu Rev Phytopathol* pp 395-436
- Rivera-Vega L, Mamidala P, Koch JL, Mason ME, Mittapalli O (2012) Evaluation of Reference Genes for Expression Studies in Ash (*Fraxinus* spp.). *Plant Mol Biol Rep* 30:242-245
- Ross H (1986) Potato breeding - Problems and perspectives. V. P. Parey, Berlin-Hambourg
- Rossi M, Goggin FL, Milligan SB, Kaloshian I, Ullman DE, Williamson VM (1998) The nematode resistance *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9750-9754
- Rosso MN, Jones JT, Abad P (2009) RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes: tools and discoveries in the post-genomic era. *Ann Rev Phytopathol* 47:207-232
- Roupe van der Voort JNAM, Lindeman W, Folkertsma R, Hutten RCB, Overmars H, Van der Vossen E, Jacobsen E, Bakker J (1998) A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor Appl Genet* 96:654-661
- Roupe van der Voort J, Kanyuka K, van der Vossen E, Bendahmane A, Mooijman P, Klein-Lankhorst R, Stiekema W, Baulcombe D, Bakker J (1999) Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol Plant Microbe Interact* 12:197-206
- Roupe van der Voort JNAM, van der Vossen E, Bakker E, Overmars H, van Zandvoort P, Hutten R, Klein Lankhorst R, Bakker J (2000) Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 101:1122-1130
- Rousselle-Bourgeois F, Mugniéry D (1995) Screening tuber-bearing *Solanum* spp. for resistance to *Globodera rostochiensis* Ro1 Woll. and *Globodera pallida* Pa2/3 Stone. *Potato Res* 38 241-249
- Roze E, Hanse B, Mitreva M, Vanholme B, Bakker J, Smant G (2008) Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Mol Plant Pathol* 9:1-10

- Sacco MA, Mansoor S, Moffett P (2007a) A RanGAP protein physically interacts with the NB-LRR protein Rx, and is required for Rx-mediated viral resistance. *Plant J* 52:82-93
- Sacco MA, Shahid M, Moffett P (2007b) A RanGAP protein physically interacts with the NB-LRR protein Rx, and is required for Rx-mediated viral resistance. *Plant J* 52:82-93
- Sacco MA, Koropacka K, Grenier E, Jaubert MJ, Blanchard A, Goverse A, Smant G, Moffett P (2009) The Cyst Nematode SPRYSEC Protein RBP-1 Elicits Gpa2-and RanGAP2-Dependent Plant Cell Death. *Plos Pathogens* 5
- Schaff JE, Nielsen DM, Smith CP, Scholl EH, Bird DM (2007) Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in *Mi*-mediated nematode resistance. *Plant Physiology* 144:1079-1092
- Shetty SM, Chandrashekar A, Venkatesh YP (2012) Promoter analyses and transcriptional profiling of eggplant polyphenol oxidase 1 gene (*SmePPO1*) reveal differential response to exogenous methyl jasmonate and salicylic acid. *J Plant Physiol* 169:718-730
- Schorneck S, Peter K, Bonas U, Lahaye T (2005) Expression levels of *avrBs3*-like genes affect recognition specificity in tomato *Bs4*- but not in pepper *Bs3*-mediated perception. *Mol Plant Microbe Interact* 18:1215-1225
- Seah S, Yaghoobi J, Rossi M, Gleason CA, Williamson VM (2004) The nematode-resistance gene, *Mi-1*, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theor Appl Genet* 108:1635-1642
- Shirasu K (2009) The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Ann Rev Plant Biology*, pp 139-164
- Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL (2006) Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 7: DOI: 10.1186/1471-2199-1187-1133
- Simmonetti E, Veronico P, Melillo MT, Delibes A, Andres MF, Lopez-Brana I (2009) Analysis of class III peroxidase genes expressed in roots of resistant and susceptible wheat lines infected by *Heterodera avenae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18:158-168
- Sinapidou E, Williams K, Nott L, Bahkt S, Tor M, Crute I, Bittner-Eddy P, Beynon J (2004) Two TIR:NB:LRR genes are required to specify resistance to *Peronospora parasitica* isolate Cala2 in *Arabidopsis*. *Plant J* 38:898-909
- Slootweg E, Roosien J, Spiridon LN, Petrescu AJ, Tameling W, Joosten M, Pomp R, van Schaik C, Dees R, Borst JW et al. (2010) Nucleocytoplasmic distribution is required for activation of resistance by the potato NB-LRR receptor Rx1 and is balanced by its functional domains. *Plant Cell* 22:4195-4215
- Sobczak M, Avrova A, Jupowicz J, Phillips MS, Ernst K, Amar K (2005) Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance Hero gene. *Mol Plant-Microbe Interact.* 18:158-168
- Sobczak M, Janakowski S, Fudali S, Kerlan MC, Mugniery D, Golinowski W (2008) Histology of defence responses of resistant *Solanum sparsipilum* and *S. spegazzinii* lines to infection with *Globodera pallida*. Exploiting genomics to understand plant-nematode interactions. Proceedings of the second COST 872 annual meeting Postojna, SVN (2008-05-26 - 2008-05-29)
- Sobczak M, Golinowski W (2009) Structure of Cyst Nematode Feeding Sites. *Cell Biology of Plant Nematode Parasitism*. In: Berg R, Taylor C (eds). Springer Berlin / Heidelberg, pp 153-187

- Sobczak M, Golinowski W (2011) Cyst Nematodes and Syncytia. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Netherlands, pp 61-82
- Sohn KH, Lee SC, Jung HW, Hong JK, Hwang BK (2006) Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Mol Biol* 61:897-915
- Stolf-Moreira R, Lemos EGM, Carareto-Alves L, Marcondes J, Pereira SS, Rolla AAP, Pereira RM, Neumaier N, Binneck E, Abdelnoor RV, de Oliveira MCN, Marcelino FC, Farias JRB, Nepomuceno AL (2011) Transcriptional Profiles of Roots of Different Soybean Genotypes Subjected to Drought Stress. *Plant Mol Biol Rep* 29:19-34
- Stone AR (1972) *Heterodera pallida* n.sp. (*Nematoda* : *Heteroderidae*), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica* 18:591-606
- Sun Q, Collins NC, Ayliffe M, Smith SM, Drake J, Pryor T and Hulbert SH (2001) Recombination between paralogues at the *Rp1* rust resistance locus in maize. *Genetics* 158:423-438
- Szakasits D, Heinen P, Wieczorek K, Hofmann J, Wagner F, Kreil DP, Sykacek P, Grundler FMW, Bohlmann H (2009) The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. *Plant J*. 57:771-784
- Tabara H, Grishok A, Mello CC (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282:430-431
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169
- Takken FLW, Albrecht M, Tameling WIL (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biology* 9:383-390
- Takken FLW, Govere A (2012) How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr Opin Plant Biology* 15:375-384
- Tameling WIL, Baulcombe DC (2007) Physical association of the NBLRR resistance protein Rx with a ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to Potato virus X. *Plant Cell* 19:1682-1694
- Tameling WIL, Takken FLW (2008) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol*. 121:243-255
- Tameling WI, Nooijen C, Ludwig N, Boter M, Sloopweg E, Govere A, Shirasu K, Joosten MH (2010) RanGAP2 mediates nucleocytoplasmic partitioning of the NB-LRR immune receptor Rx in the Solanaceae, thereby dictating Rx function. *Plant Cell* 22:4176-4194
- Tameling WIJ and Joosten MH (2007) The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71:126-134
- Tan MYA, Park TH, Alles R, Hutten RCB, Visser RGF, van Eck HJ (2009) *GpaXI<sup>tar</sup>* originating from *Solanum tarijense* is a major resistance locus to *Globodera pallida* and is localised on chromosome 11 of potato. *Theor Appl Genet* 119:1477-1487
- Tarr DE, Alexander HM (2009) TIR-NBS-LRR genes are rare in monocots: evidence from diverse monocot orders. *BMC Research Notes* 2:197
- Thiery M (1996) Etude du polymorphisme biologique et moléculaire des nématodes à kyste des Solanacées. Thèse de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, p 78

- Thurau T, Kifle S, Jung C, Cai DG (2003) The promoter of the nematode resistance gene Hs1(pro-1) activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 52:643-660
- Thilmony RL, Chen ZT, Bressan RA, Martin GB (1995) Expression of the tomato Pto gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* expressing AvrPto. *Plant Cell* 7:1529-1536
- Timmons L and Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395:854
- Ting JP, Duncan JA, Lei Y (2010) How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science* 327:286-290
- Trudgill DL, Elliott MJ, Evans K, Phillips MS (2003) The white potato cyst nematode (*Globodera pallida*) - a critical analysis of the threat in Britain. *Ann appl Biol* 143:73-80
- Tsuda K, Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biology* 13:459-465
- Turner SJ (1989) New sources of resistance to potato cyst-nematodes in the Commonwealth Potato Collection. *Euphytica* 42:145-153
- Tytgat T, Vanholme B, De Meutter J, Claeys M, Couvreur M, Vanhoutte I, Gheysen G, Van Criekinge W, Borgonie G, Coomans A (2004) A new class of ubiquitin extension proteins secreted by the dorsal pharyngeal gland in plant parasitic cyst nematodes. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:846-852
- Tzortzakakis EA, Adam MAM, Blok VC, Paraskevopoulos C, Bourtzis K (2005) Occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes on tomato in Greece. *Eur J Plant Pathol* 113:101-105
- Ueda H, Yamaguchi Y, Sano H (2006) Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants. *Plant Mol Biol* 61:31-45
- Vaghchhipawala Z, Bassuner R, Clayton K, Lewers K, Shoemaker R, Mackenzie S (2001) Modulations in gene expression and mapping of genes associated with cyst nematode infection of soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 14:42-54
- van der Biezen EA, Jones JDG (1998) The NB-ARC domain: A novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol* 8:R226-R227
- van der Hoorn RAL, Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20:2009-2017
- Van der Vossen EAG, Rouppe van der Voort JNAM, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H, Baulcombe DC, Bakker J, Stiekema WJ, Klein-Lankhorst RM (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J* 23:567-576
- van Megen H, van den Elsen S, Holterman M, Karssen G, Mooyman P, Bongers T, Holovachov O, Bakker J, Helder J (2009) A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 11:927-927
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: DOI: 10.1186/gb-2002-1183-1187-research0034

- Vanholme B, Mitreva M, Van Criekinge W, Logghe M, Bird D, McCarter JP, Gheysen G (2006) Detection of putative secreted proteins in the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Parasitology Research* 98:414-424
- Ve T, William S, Valkov E, Ellis JG, Dodds PN and Kobe B (2011) Crystallization, X-ray diffraction analysis, and preliminary structure determination of the TIR domain from the flax resistance protein L6. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun* 67:237-240
- Vercauteren I, Engler JD, De Groot R, Gheysen G (2002) An *Arabidopsis thaliana* pectin acetyltransferase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol Plant Microbe Interact* 15:404-407
- Vercauteren I, Van Der Schueren E, Van Montagu M, Gheysen G (2001) *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Mol Plant Microbe Interact* 14:288-299
- Veremis JC, Roberts PA (1996a) Differentiation of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* novel resistance phenotypes in *Lycopersicon peruvianum* and derived bridge-lines. *Theor Appl Genet* 93:960-967
- Veremis JC, Roberts PA (1996b) Identification of resistance to *Meloidogyne javanica* in the *Lycopersicon peruvianum* complex. *Theor Appl Genet* 93:894-901
- Veremis JC, Roberts PA (1996c) Relationships between *Meloidogyne incognita* resistance genes in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. *Theor Appl Genet* 93:950-959
- Veremis JC, Heusden AWv, Roberts PA (1999) Mapping a novel heat-stable resistance to *Meloidogyne* in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor Appl Genet* 98:274-280
- Veremis JC, Roberts PA (2000) Diversity of heat-stable genotype specific resistance to *Meloidogyne* in Maranon races of *Lycopersicon peruvianum* complex. *Euphytica* 111:9-16
- Veronico P, Giannino D, Melillo MT, Leone A, Reyes A, Kennedy MW, Bleve-Zacheo T (2006) A novel lipoxygenase in pea roots. Its function in wounding and biotic stress. *Plant Physiol* 141:1045-1055
- Vos P, Simons G, Jesse T, Wijbrandi J, Heinen L, Hogers R, Frijters A, Groenendijk J, Diergaarde P, Reijans M, Fierens-Onstenk J, de Both M, Peleman J, Liharska T, Hontelez J, Zabeau M (1998) The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat Biotechnol* 16:1365-1369
- Vuorinen AL, Gammelgard E, Auvinen P, Somervuo P, Dere S, Valkonen JPT (2010) Factors underpinning the responsiveness and higher levels of virus resistance realised in potato genotypes carrying virus-specific R genes. *Ann appl Biol* 157:229-241
- Wang ZH, Potter RH, Jones MGK (2003) Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. *Mol Plant Pathol* 4:361-371
- Wang J, Hussey R, Davis E, Baum T, Mitchum M (2005) Identification and functional analysis of soybean cyst nematode parasitism proteins with a role in virulence. *Phytopathology* 95:S108-S109
- Wang WM, Devoto A, Turner JG, Xiao SY (2007) Expression of the membrane-associated resistance protein RPW8 enhances basal defense against biotrophic pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 20:966-976
- Weaver M L, Swiderski MR, Li Y, Jones JD (2006) The *Arabidopsis thaliana* TIR-NB-LRR R-protein, RPP1A; protein localization and constitutive activation of defence by truncated alleles in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant J* 47:829-840



- Wieczorek K, Golecki B, Gerdes L, Heinen P, Szakasits D, Durachko DM, Cosgrove DJ, Kreil DP, Puzio PS, Bohlmann H, Grundler FMW (2006) Expansins are involved in the formation of nematode-induced syncytia in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 48:98-112
- Wieczorek K, Hofmann J, Blöchl A, Szakasits D, Bohlmann H, Grundler FMW (2008) *Arabidopsis* endo-1,4- $\beta$ -glucanases are involved in the formation of root syncytia induced by *Heterodera schachtii*. *Plant J* 53:336-351
- Wiermer M, Feys BJ and Parker JE (2005) Plant immunity: The EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* 8:383-389
- Wiermer M, Palma K, Zhang Y, Li X (2007) Should I stay or should I go? Nucleocytoplasmic trafficking in plant innate immunity. *Cell Microbiol* 9:1880-1890
- Williamson VM (1998) Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annu Rev Phytopathol* 36:277-293
- Williamson VM, Gleason CA (2003) Plant-nematode interactions. *Curr Opin Plant Biol* 6:327-333
- Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G and Desveaux D (2010) The type III effector HopF2*Pto* targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2349-2354
- Wirthmueller L, Zhang Y, Jones JD, Parker JE (2007) Nuclear accumulation of the *Arabidopsis* immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense. *Curr Biol* 17:2023-2029
- Wisser RJ, Sun Q, Hulbert SH, Kresovich S, Nelson RJ (2005) Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance. *Genetics* 169:2277-2293
- Wollenweber HW (1923) Krankheiten und Beschädigungen der Kartoffel. Arb Forschungsinst f Kartoffelbau Heft 7 Berlin
- Wu T, Xie C (2011) Cloning and activity analysis of the promoter of potato protein kinase gene StPK1. *Scientia Agricultura Sinica* 44:867-873
- Wubben MJE, Su H, Rodermel SR, Baum TJ (2001) Susceptibility to the sugar beet cyst nematode is modulated by ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1206-1212
- Wubben MJE, Jin J, Baum TJ (2008) Cyst nematode parasitism of *Arabidopsis thaliana* is inhibited by salicylic acid (SA) and elicits uncoupled SA-independent pathogenesis-related gene expression in roots. *Mol Plant Microbe Interact* 21:424-432
- Wyss U, Grundler FMW, Munch A (1992) The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38:98-111
- Xie FL, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang BH (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* 80:75-84
- Xu X, Pan SK, Cheng SF, Zhang B, Mu DS, Ni PX, Zhang GY, Yang S, Li RQ, Wang J, Orjeda G, Guzman F, Torres M, Lozano R, Ponce O, Martinez D, De la Cruz G, Chakrabarti SK, Patil VU, Skryabin KG, Kuznetsov BB, Ravin NV, Kolganova TV, Beletsky AV, Mardanov AV, Di Genova A, Bolser DM, Martin DMA, Li GC, Yang Y, Kuang HH, Hu Q, Xiong XY, Bishop GJ, Sagredo B, Mejia N, Zagorski W, Gromadka R, Gawor J, Szczesny P, Huang SW, Zhang ZH, Liang CB, He J, Li Y, He Y, Xu JF, Zhang YJ, Xie BY, Du YC, Qu DY, Bonierbale M, Ghislain M, Herrera MD, Giuliano G, Pietrella M, Perrotta G, Facella P, O'Brien K, Feingold SE, Barreiro LE, Massa GA, Diambra L, Whitty BR, Vaillancourt B, Lin HN, Massa A, Geoffroy M, Lundback S, DellaPenna D, Buell CR, Sharma SK, Marshall DF, Waugh R, Bryan GJ, Destefanis M, Nagy I, Milbourne D, Thomson SJ, Fiers M, Jacobs JME, Nielsen KL,

- Sonderkaer M, Iovene M, Torres GA, Jiang JM, Veilleux RE, Bachem CWB, de Boer J, Borm T, Kloosterman B, van Eck H, Datema E, Hekkert BTL, Goverse A, van Ham R, Visser RGF (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475:189-U194
- Yaghoobi J, Kaloshian I, Wen Y, Williamson VM (1995) Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor Appl Genet* 91:457-464
- Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H (2004) Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes and Expression* 1679:279-287
- Yang G, Zhou RC, Tang T, Chen XS, Ouyang JH, He L, Li WJ, Chen SF, Guo MM, Li XN, Zhong CR, Shi SH (2011) Gene Expression Profiles in Response to Salt Stress in *Hibiscus Tiliaceus*. *Plant Mol Biol Rep* 29:609-617
- Yue JX, Meyers BC, Chen JQ, Tian DC, Yang SH (2012) Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytol* 193:1049-1063
- Zeng LR, Velasquez AC, Munkvold KR, Zhang JW, Martin GB (2012) A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *Plant J* 69:92-103
- Zhang XC, Gassmann W (2003) RPS4-Mediated disease resistance requires the combined presence of RPS4 transcripts with full-length and truncated open reading frames. *Plant Cell* 15:2333-2342
- Zhang Y, Dorey S, Swiderski M, Jones JD (2004) Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *Plant J* 40:213-224
- Zhang XC, Kim SH, Gassmann W (2009) Regulation of plant disease resistance gene function by alternative splicing. *Phytopathology* 99:S165-S166
- Zhang M, Kadota Y, Prodromou C, Shirasu K, Pearl LH (2010) Structural basis for assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD protein complexes: implications for chaperoning of NLR innate immunity receptors. *Mol Cell* 39:269-281
- Zhou JM and Chai J (2008) Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Curr Opin Microbiol* 11:179-185
- Zhu XY, Li XP, Chen WX, Chen JY, Lu WJ, Chen L, Fu DW (2012) Evaluation of New Reference Genes in Papaya for Accurate Transcript Normalization under Different Experimental Conditions. *Plos One* 7: e44405
- Zipfel C and Rathjen JP (2008). Plant Immunity: AvrPto targets the frontline. *Curr Biol* 18:R218-R220

## 7. Annexes

### Annexe 1

#### Milieu SOC

##### Milieu 1

- 97 ml ddH<sub>2</sub>O
- - 2 g bactotryptone
- -0,5 Yeast extract
- - 1 ml solution mère 1 M NaCl
- -0,25 ml solution mère 1 M KCl
- pH7

##### Solution 2

(1 M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O + 1 M MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O  
(PM 203,31 PM 246,48)  
(2,0331 g + 2,4648g) Dans QSP 10 ml H<sub>2</sub>O

Solution mère de glucose 2M (sterilisé par filtration sur 0,2 µM)

##### Milieu SOC : mélanger

- 100 ml de milieu 1 (SOB)
  - 1 ml de solution 2 (2M Mg<sup>++</sup> stock)
  - 1 ml de solution mère de glucose 2M
- Stériliser à nouveau par filtration sur 0,2 µM

## Annexe 2

### MILIEU LURIA BROTH (LB)

1. Mélanger :
  - 10 g de Tryptone
  - 5 g de Yeast extract
  - 10 g de NaCl
  - 10 g d'Agar (milieu solide uniquement)
  - qsp 1 l d'eau distillée
2. Stérilisation par autoclavage

## Annexe 3

### COLORATION PAS/NAPHTOL BLUE BLACK

Les différentes étapes de la double coloration :

<b>Solution</b>	<b>Temps et température</b>
Eau distillée	10 min
Acide périodique	10 min à 45°C
Eau courante	10 min
Eau distillée	30 secondes
Shiff	10 min à 4°C (obscurité)
Eau courante	10 min
Naphtol blue black	7 min à 45°C
Eau courante	10 min

## Résumé

Les nématodes à kystes sont l'un des bioagresseurs causant le plus de dégâts sur les cultures de pommes de terre. La résistance trouvée chez l'accension spl88S.329.18, issue de l'espèce *Solanum sparsipilum* est caractérisée par un déterminisme oligogénique avec un QTL à effet fort localisé sur le chromosome V (*GpaV<sub>spl</sub>*) et un QTL mineur localisé sur le chromosome XI (*GpaXI<sub>spl</sub>*). Pour obtenir une résistance de haut niveau, l'effet du QTL *GpaV<sub>spl</sub>*, doit être complété par celui du QTL à effet faible *GpaXI<sub>spl</sub>*. Par génomique comparative, le locus *GpaV* a été localisé dans un intervalle compris entre 16 et 60 kb sur les génomes de la tomate et des espèces apparentées à la pomme de terre, *Solanum demissum* et *Solanum phureja*. Deux gènes ont été annotés dans cet intervalle sur les génomes de la tomate et de *S. demissum* : le premier appartient à la famille des TIR-NBS-LRR (TNL), famille de gènes de résistance classiques, et le second appartient à la famille des « mitochondrial, transcription termination factor » (mTERF), dont l'implication dans des mécanismes de résistance n'a jamais été démontrée.

Les objectifs de ma thèse étaient d'identifier le(s) gène(s) responsable(s) de la résistance à *G. pallida*, conférée par le locus *GpaV<sub>spl</sub>*, et d'étudier sa régulation. Suite à la publication de la séquence du génome de *S. phureja*, en 2011, nous avons mis en évidence que le locus *GpaV* était dupliqué chez *S. phureja* et que cette duplication était également présente chez *S. sparsipilum*. Les quatre gènes annotés au locus *GpaV<sub>spl</sub>* ont été nommés Spl\_mTERF18430, Spl\_TNL18429, Spl\_mTERF18453 et Spl\_TNL18428.

L'effet des deux gènes Spl\_mTERF18430 et Spl\_TNL18428 sur la résistance à *G. pallida* a été analysé *via* des expériences de transformation génétique suivies par des tests de résistance sur les plantes transformées. Un effet partiel du gène Spl\_TNL18428 sur la résistance à *G. pallida* a été mis en évidence par complémentation de plantes sensibles. Aucun effet significatif n'a été détecté pour le gène Spl\_mTERF18430. Des expériences d'extinction génique suggèrent que le deuxième gène TIR-NBS-LRR, Spl\_TNL18429, qui est également exprimé dans les racines et qui présente un fort pourcentage d'identité de séquence avec le gène Spl\_TNL18428, pourrait également être impliqué dans la résistance à *G. pallida*. L'expression du gène rapporteur GFP, placé sous le contrôle du promoteur du gène Spl\_TNL18428, est fortement induite dans les cellules situées autour du syncytium. Ceci renforce l'hypothèse d'une implication du gène Spl\_TNL18428 dans la résistance à *G. pallida*, car la localisation de l'expression de la GFP est similaire à celle de la nécrose, qui est caractéristique de la réaction développée par les plantes résistantes autour du syncytium induit par les nématodes.

En tenant compte des données bibliographiques récentes, montrant que plusieurs gènes NBS-LRR peuvent être indispensables à l'expression d'une résistance, nos résultats suggèrent que les deux gènes Spl\_TNL18428 et Spl\_TNL18429 sont nécessaires à l'expression de la résistance à *G. pallida*.

**Mots-clés :** pomme de terre, *Solanum tuberosum*, nématode à kyste, *Globodera pallida*, résistance, expression génique, RT-qPCR