



HAL
open science

Résistances du pommier à la tavelure et au feu bactérien : interactions entre les résistances génétiques et induites par les SDP

Juliette Benejam

► **To cite this version:**

Juliette Benejam. Résistances du pommier à la tavelure et au feu bactérien : interactions entre les résistances génétiques et induites par les SDP. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2021. Français. NNT : 2021ANGE0013 . tel-03421634

HAL Id: tel-03421634

<https://theses.hal.science/tel-03421634>

Submitted on 9 Nov 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : « *Génétique, génomique et bio-informatique* »

Par

Juliette BENEJAM

**« Résistances du pommier à la tavelure et au feu bactérien :
Interactions entre les résistances génétiques et induites par les SDP »**

Thèse présentée et soutenue à Angers/Beaucouzé, le 12/02/2021

Unité de recherche : UMR 1345 - IRHS, 42 rue Georges Morel 49070 Beaucouzé

Rapporteurs avant soutenance :

Fabienne BAILLIEUL, Professeure, Université de Reims Champagne-Ardenne

Béatrice DENOYES-ROTHAN, Ingénieure de recherche, UMR 1332 BFP, Villenave-d'Ornon

Composition du Jury :

Examineurs : Elsa BALLINI, Maître de conférences, Institut Agro Montpellier
Philippe SIMONEAU, Professeur, Université d'Angers _ *Président du jury*

Dir. de thèse : Charles-Eric DUREL, Directeur de recherche, INRAE Angers
Encadrante : Laure PERCHEPIED, Maître de conférences, Université d'Angers

Encadrante invitée : Marie-Noëlle BRISSET, Directrice de recherche, INRAE Angers

Remerciements

Je souhaite remercier Fabienne Baillieul, Béatrice Denoyes-Rothan pour avoir accepté de lire mon manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse ainsi que Marie-Laure Pilet-Nayel même si les règles de l'école doctorale en ont décidé autrement. Je remercie également Elsa Ballini et Philippe Simoneau, les autres membres de mon jury pour leur participation à cette évaluation.

Un très très grand merci à mes trois encadrants de thèse Charles-Eric Durel, Laure Perchepied et Marie-Noëlle Brisset pour leur suivi pendant ces trois années passionnantes.

Charles-Eric, un grand merci pour vos nombreuses explications sur le monde des statistiques et de la génétique, pour votre rigueur dans toutes les relectures et pour tous vos conseils avisés.

Laure, je te remercie pour ton écoute attentive, pour m'avoir fait découvrir l'enseignement avec Catherine (merci à elle aussi) et pour tout le temps que tu m'as consacré.

Marie-Noëlle, merci pour ta franchise, pour tes précieux conseils. Je retiendrai que les meilleures présentations sont celles qui sont épurées, alignées et sans faute d'orthographe !

Enfin, merci à tous les trois pour cette dernière année 2020 qui s'est bien déroulée : un article, la fin de ma thèse, le congrès RGC10, malgré des conditions plus qu'étranges et parfois difficiles.

Je remercie les membres de mon comité de suivi individuel, Marie Turner, Maria Manzanares-Dauleux et Jean-Benoît Morel pour leurs nombreux conseils. Les discussions lors de ces deux CSI, parfois déstabilisantes mais surtout enrichissantes m'ont permis d'avancer et de garder en tête les objectifs.

Je souhaite remercier également toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces trois années :

Merci à la plateforme EPGV, Marie-Christine Le Paslier, Aurélie Chauveau et toutes les personnes que j'ai croisées pour leur accueil à Evry et pour m'avoir formée aux analyses des scans de génotypage.

Merci à la plateforme Phenotic pour le suivi des nombreux tests en serre ! Merci Céline, Michel, Christian, Rémi, Daniel, encore Michel et tous les autres. J'ai passé beaucoup de temps dans les serres à observer l'évolution de quelques milliers de pommier (et peut-être même des dizaines de milliers) et à vous solliciter mais pas pour rien puisque les résultats des tests auxquels vous avez participé ont été publiés ! Alors encore merci.

Je voudrais remercier également la plateforme PASM pour les analyses de métabolites et plus particulièrement Romain Larbat pour les nombreux échanges sur les analyses de ces données. J'ai appris beaucoup de choses sur les métabolites grâce à toi et ça va continuer puisque les analyses ne sont pas finies.

Merci à l'Unité Expérimentale pour le « chouchoutage » des vergers comme dirait Elisa. J'ai adoré les récoltes de greffons. Même sous la pluie et dans le froid c'était toujours des moments très agréables.

Je voudrais remercier les membres de l'équipe Respom et du bâtiment B de m'avoir accueillie et aidée. Merci à l'équipe PAIGE qui, avec le sourire, a toujours été d'une aide précieuse pour tous les dossiers et soucis administratifs. Un immense merci à tous ceux qui ont répondu présents pour les traitements, les notations, les tris de tubes et les prélèvements : merci Emilie, Nicolas, Aurélien, Elisabeth, Jaiana, Elisa, Caroline, Hélène, Matthieu, Christelle, Raphaël, Anthony et tous les autres ... Je voudrais remercier également tous ceux qui m'ont apporté de précieux conseils pour les analyses de mes données. Merci Matthieu, Hélène, Caroline, Emilie, Mathilde, Diana et j'en oublie sûrement.

Elisa, je crois que tu es celle à qui je dois le plus la réussite de toutes ces manips. Tu as fait mon « éducation » de jeune thésarde naïve, tu m'as fait découvrir les labos, les serres et le fonctionnement de l'unité. Tu as été d'une aide plus que précieuse dans toute l'organisation, l'encadrement des stagiaires, la réalisation des tests et des analyses au labos. Je n'aurais pas pu présenter autant de résultats sans ta participation active. Alors un très grand merci à toi et à votre joyeux binôme avec Caroline :)

Merci à tous les stagiaires curieux et volontaires que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont contribué aux résultats de cette thèse. Merci Louise, Camille, Félix, Niels et Wendy !

Je voudrais remercier tous les doctorants et les membres de l'association Greenyd ! J'ai eu la chance de participer activement à ce projet et il mérite d'être poursuivi. Je retiendrai la solidarité et les moments de convivialité. Mais je tiens à remercier plus particulièrement les deux meilleurs doctorants Xabi et Marie-Charlotte (même si vous oubliez vite la solidarité bureau dans les jeux) ! Je vous souhaite pleins de résultats et de réussites dans vos thèses et même en dehors :)

Merci également à tous les Zbest pour tous ces moments de partage et votre bonne humeur, merci Jaiana, David, Patricia, Sylvain, Marie-Charlotte, Xabi, Julien.

Merci à ma partenaire de voyage Emma. Merci à mon ex-voisin Jérémy. Merci à mon binôme Enora.

Merci à la famille Foltzer. Nathalie, Alain merci pour votre curiosité pour les pommiers, mon sujet de thèse et les OGM et merci pour les messages de soutien.

Je voudrais dire aussi merci à toute ma famille qui m'encourage. Merci à mes grands-parents (je n'oublie pas la pomme carrée !), ma tante, ma cousine.

Et je voudrais dire un immense merci à mes grandes sœurs et mes parents pour leur soutien inconditionnel pendant toutes ces années d'études. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir poussée à donner le meilleur. Merci de m'avoir encouragée à faire ce que j'aime.

Et finalement, merci Etienne de me supporter tous les jours et pour ton 'aide' dans la rédaction de cette thèse. Je t'ai rencontré au tout début de cette thèse, merci pour les moments déjà partagés et pour les prochains.

« La vie ce n'est pas d'attendre que l'orage passe, c'est d'apprendre à danser sous la pluie »

Sénèque



Sommaire

Liste des abréviations.....	4
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	6
1- Les pathosystèmes Pommier - <i>Venturia inaequalis</i> / <i>Erwinia amylovora</i>	7
2- Les résistances génétiques du pommier	22
3- Les stimulateurs de défense des plantes étudiés sur le pommier.....	33
4- Objectifs de la thèse	37
Chapitre II : Matériel et méthodes	40
1- Matériel végétal.....	41
2- Mise en place de tests pathologiques et évaluation	46
3- Analyses transcriptionnelles et métabolomiques	51
Chapitre III : Efficacité de protection des résistances génétiques et des résistances induites par les SDP	56
1- Variabilité de la sensibilité de génotypes de pommier à <i>Venturia inaequalis</i> et <i>Erwinia amylovora</i> en fonction du traitement SDP.....	58
2- Efficacité de protection des résistances génétiques et induites par les SDP.....	68
3- Corrélations entre les niveaux de résistance.....	74
4- Discussion chapitre III	78
Chapitre IV : Déterminants génétiques impliqués dans les résistances génétiques et les résistances induites par les SDP	89
1- Acibenzolar-S-methyl and resistance quantitative trait loci complement each other to control apple scab and fire blight	91
2- Complémentation de la résistance par l'ASM : focus sur le QTL qT1	126
3- Recherche de QTLs d'efficacité de l'ASM	128
4- Exploration des gènes candidats sous les intervalles des principaux QTLs	130
5- Discussion chapitre IV.....	132
Chapitre V : Mécanismes moléculaires constitutifs et induits impliqués dans les résistances génétiques et les résistances induites par les SDP	137
1- Caractérisation bio-informatique des défenses du pommier.....	139
2- Les défenses constitutives sont-elles impliquées dans l'efficacité des résistances génétiques et/ou induites par les SDP ?	155
3- Quelles sont les défenses induites impliquées dans l'efficacité des résistances génétiques et/ou des traitements SDP ?.....	169
4- Discussion chapitre V.....	183
Chapitre VI : Discussion générale et perspectives.....	192
1- Analyse critique des choix méthodologiques et stratégiques	194
2- Les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances du pommier	199
3- Combinaison des QTLs et de l'ASM pour une lutte durable ?	203
Annexes	209
1- Chapitre III	209
2- Chapitre IV	212
3- Chapitre V	226
Références bibliographiques	241

Liste des abréviations

ABA : ABscisic Acid	ETS : Effector-Triggered Susceptibility
ACP : Analyse en Composante Principale	FC : Fold Change
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	FDS : Farnesyl diphosphate synthase
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	FEM : Fondation Edmund Mach
AGG ou Agg : Agglutinine	GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
AGTLC : Acides gras à très longue chaîne	GDDH13 : Golden Delicious Doubled Haploid 13
ANR : Agence Nationale de la Recherche	GS/CS : Glucan synthase/Callose synthase
APOX : Ascorbate Peroxidase	GST : Glutathione S-transferase
ARN : Acide RiboNucléique	GWAS : Genome-Wide Association Study
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	HFTH1 : TriHaploid HanFu line 1
ASM : Acibenzolar-S-Methyl	HMGR : Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
AUDPC : Area Under Disease Progress Curve	HPLC-MS/MS : High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
b, kb, Mb : base, kilobase, Mégabase	HR : Hypersensitive Response
BABA : amino acid β -AminoButyric Acid	Hrp : hypersensitive reaction and pathogenicity
BAP : département INRAE de Biologie et Amélioration des Plantes	INA : 2,6-dichloro-IsoNicotinic Acid
BLUP : Best Linear Unbiased Predictor	INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
BTH : BenzoTHiadiazole	JA : Jasmonic Acid
CAD : Cinnamoyl-CoA reductase/Epimerase	JMT : Jasmonate O-methyltransferase
CaIS : Callose synthase	KO : Knock-Out
CCe : Core Collection étendue	LAE : Laboratoire Agronomie et Environnement de Nancy
CFU : Colony-Forming Units	LED : Light-Emitting Diode
CHS/STS : Chalcone/stilbene synthase	LOD : Logarithm Of Odds
COS-OGA : ChitoOlygoSaccharides - OligoGAlacturonides	LOX2 : Lipoxygenase 2
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	MAMP : Microbe-Associated Molecular Patterns
CSL : Cysteine sulfoxide lyase (Alliinase)	Mt : Millions de tonnes
CT : Cycle de seuil de qPCR	MUNQ : Malus UNiQue genotype code
DAMP : Damage-Associated Molecular Patterns	NPR1 : Nonexpressor of pathogenesis-related 1
DARE : Durable Apple Resistance in Europe	
DFR : Dihydroflavonol 4-reductase	
Ea : <i>Erwinia amylovora</i>	
EIN3 : Ethylene insensitive 3	
ETI : Effectors-Triggered Immunity	

OQ : Organismes de Quarantaine / **ORNQ** : Organismes Règlementés Non Quarantaine
PACA : Provence Alpes Cotes d'Azur
PAL : Phenylalanine Ammonia-Lyase
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns
PASM : Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDS : Phytoène Désaturase
Pect : Pectinesterase
PhP : Phosphonate de Potassium
PLS-DA : Partial Least Squares - Discriminant Analysis / **sPLS-DA** : sparse Partial Least Squares - Discriminant Analysis
PPO : Polyphenol oxidase
PR : Resistance Protein
PR-1 : Pathogenesis related protein 1 (Cysteine-rich secretory protein)
PR-10 : Pathogenesis related protein 10 (Bet v1, Mal d1 family)
PR-12 : Pathogenesis related protein 12 (Gamma thionin/defensin)
PR-13 : Pathogenesis related protein 13 (Thionin)
PR-14 : Pathogenesis related protein 14 (Protease inhibitor/seed storage/LTP family)
PR-15,PR-16 : Pathogenesis related protein 15,16 (Cupin/germin/oxalate oxidase)
PR-17 : Pathogenesis related protein 17 (Plant basic secretory protein)
PR-2 : Pathogenesis related protein 2 (Glycosyl hydrolase family 17)
PR-3,PR-11 : Pathogenesis related protein 3,11 (Chitinase class I)

PR-4 : Pathogenesis related protein 4 (Barwin domain protein)
PR-5 : Pathogenesis related protein 5 (Thaumatin)
PR-6 : Pathogenesis related protein 6 (Serine protease inhibitor)
PR-8 : Pathogenesis related protein 8 (Chitinase A/Glycosyl hydrolase family 18)
PRI : Plant Resistance Inducer
PRR : Pattern Recognition Receptors
PTI : PAMPs-Triggered Immunity
qPFD : Puce à Faible Densité quantitative
QTL : Quantitative Trait Loci
RFI : Recherche Formation Innovation
RIL : Recombinant Inbred Lines
RT-qPCR : Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction
SA : Salicylic Acid
SABP2 : Salicylic Acid Binding protein 2
SAM : Sélection Assistée par Marqueurs
SAR : Systemic Acquired Resistance
SDP : Stimulateur de défense des plantes
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SSR : Simple Sequence Repeats
T3SS : Type 3 Secretion System
TFL1 : Terminal Flower 1
TIR-NBS-LRR : Toll and mammalian Interleukin-1Receptor - Nucleotide-Binding Site - Leucine-Rich Repeat
TM : TransMembranaire
TPS : Terpene Synthase
TuA : Tubulin alpha
UE : Union Européenne
UV-C : Ultra Violet - C
Vi : *Venturia inaequalis*
WAK : Wall-associated kinase
WRKY : WRKY transcription factor
ZNP : Zone Non Polymorphes

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

1- Les pathosystèmes Pommier - *Venturia inaequalis* / *Erwinia amylovora*

a- Le pommier

Famille, genre, espèces et variétés

Le pommier est un arbre fruitier qui appartient au genre *Malus* de la famille des Rosacées. Au sein du genre *Malus*, il existe plus d'une trentaine d'espèces botaniques réparties dans le monde (Phipps et al., 1990; Fiala, 1994) dont les 5 plus connues sont *Malus domestica*, *Malus sieversii*, *Malus sylvestris*, *Malus orientalis* et *Malus baccata* (**Figure 1**). L'ensemble de la production de pommes est issue de l'espèce *Malus domestica* qui compte plus de 10 000 variétés différentes (Juniper and Mabberley, 2006; Cornille et al., 2013), même si aujourd'hui la production mondiale n'est représentée majoritairement que par une dizaine de variétés (Giraud et al., 2014) : 'Fuji', 'Delicious', 'Golden Delicious', 'Gala', 'Granny Smith', 'Idared', 'Jonagold', 'Braeburn', 'Cripps Pink', 'Jonathan', 'Elstar' et 'McIntosh' (Badenes and Byrne, 2012).

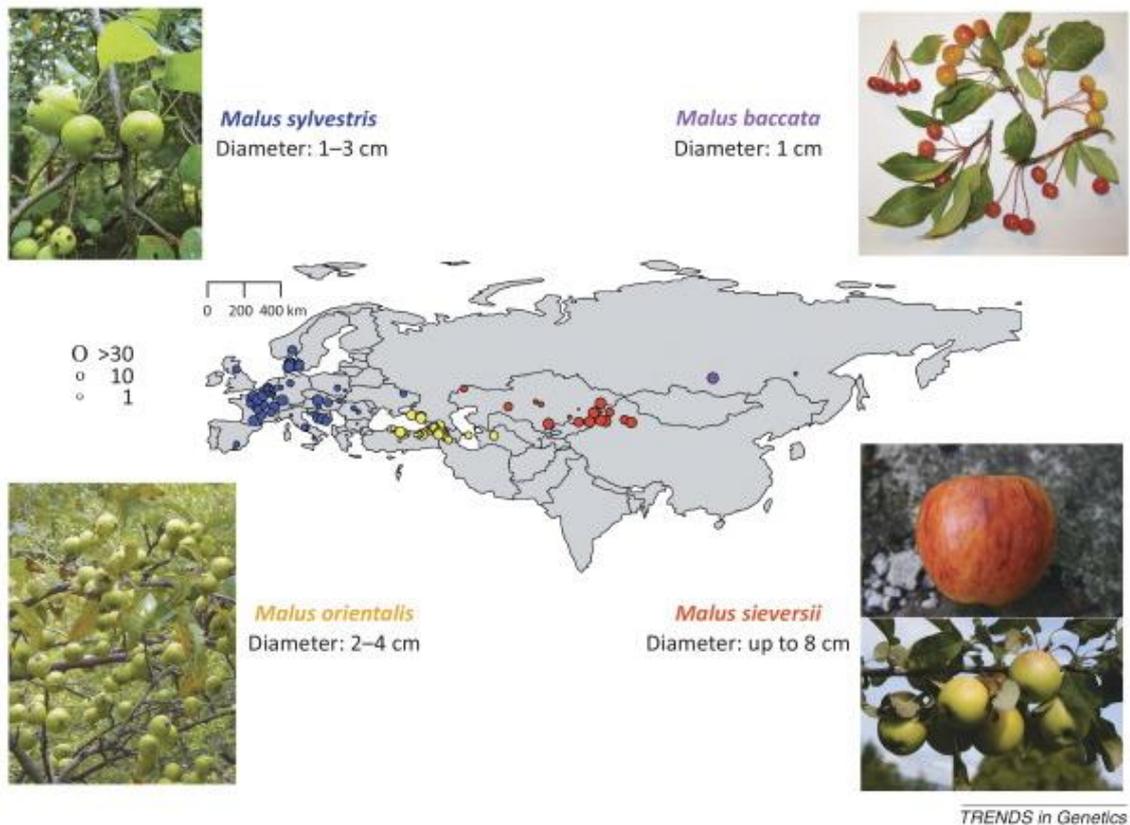


Figure 1 : Répartition et principales caractéristiques morphologiques des pommiers sauvages. La répartition des espèces peut être déduite de l'origine géographique des accessions figurant dans les études publiées : *Malus sylvestris* (bleu), *Malus orientalis* (jaune), *Malus sieversii* (rouge) et *Malus baccata* (violet). La surface des cercles est proportionnelle au nombre d'accessions. Des photos des fruits des différents pommiers sauvages sont fournies, ainsi que leurs diamètres respectifs (Cornille et al., 2014).

Origine et domestication

Le pommier domestique ou *Malus domestica* est issu du croisement entre plusieurs espèces de *Malus* d'après des analyses de diversité réalisées à partir de données historiques, morphologiques et génétiques (Harris et al., 2002; Juniper and Mabberley, 2006; Velasco et al., 2010; Cornille et al., 2012). L'origine de cette espèce proviendrait de l'espèce *Malus sieversii* en Asie centrale (Robinson et al., 2001; Forte et al., 2002; Harris et al., 2002; Juniper and Mabberley, 2006; Velasco et al., 2010). La propagation et la commercialisation de cette culture le long de la Route de la soie depuis la Chine jusqu'à l'Europe de l'ouest (**Figure 2** ; Juniper and Mabberley, 2006) aurait contribué à la diversification de l'espèce *Malus sieversii*. Des flux de gènes entre cette espèce et plusieurs autres espèces, notamment l'espèce européenne *Malus sylvestris* ont contribué à la domestication du pommier cultivé (Cornille et al., 2012, 2013).

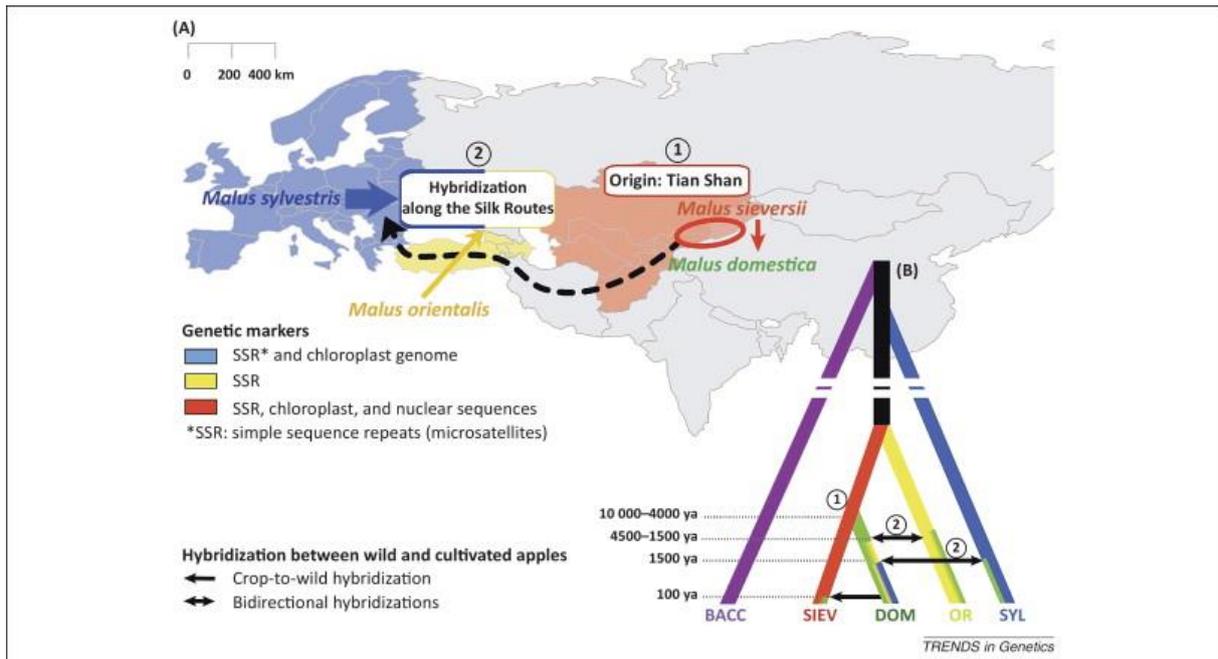


Figure 2 : Histoire évolutive des pommiers cultivés. (A) Cette histoire a été révélée par des études de population récentes en utilisant différents types de marqueurs moléculaires pour suivre les inférences évolutives. (1) Origine dans les montagnes du Tian Shan de *Malus sieversii*, suivie de (2) dispersion de l'Asie vers l'Europe le long de la route de la soie, facilitant l'hybridation et l'introgession des 'crabapple' caucasiens et européens. L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la contribution génétique de diverses espèces sauvages à la composition génétique de *Malus domestica*. (B) Relations généalogiques entre les pommiers sauvages et les pommiers cultivés. Les dates approximatives des événements de domestication et d'hybridation entre les espèces sauvages et cultivées sont détaillées dans la légende. Abbréviations : BACC, *Malus baccata*; DOM, *Malus domestica*; OR, *Malus orientalis*; SIEV, *Malus sieversii*; SYL, *Malus sylvestris*; ya, years ago (Cornille et al., 2014).

Complexité du génome

Le génome complet du pommier *Malus domestica* a été séquencé pour la première fois en 2010 (Velasco et al., 2010) à partir de la variété Golden Delicious. Pour s'affranchir du haut niveau d'hétérozygotie du génome lors de l'assemblage, un haploïde doublé nommé GDDH13, dérivé d'un ovule non fécondé issu d'un individu S1 (self = autofécondation) de cette variété a été utilisé lors d'un deuxième séquençage complet en 2017 (Daccord et al., 2017). En 2019 un troisième séquençage complet a été réalisé à partir de la lignée homozygote dérivée de l'anthère HFTH1 issue de la variété Hanfu (Zhang, Hu, et al., 2019). Encore plus récemment, un nouveau séquençage complet de la variété commerciale Gala (hétérozygote) a été obtenu (Broggini et al., 2020).

Le génome du pommier est composé de 17 chromosomes, généralement à l'état diploïde, même si la fréquence d'individus triploïdes est importante dans les variétés anciennes (~20%, Lassois et al., 2016; Urrestarazu et al., 2016). Ces 17 chromosomes sont issus d'une duplication récente du génome à partir d'un ancêtre commun de la famille des Rosacées composé de 9 chromosomes (Jung et al., 2012). Les homologies entre chromosomes ou parties de chromosome sont représentées dans la **Figure 3**.

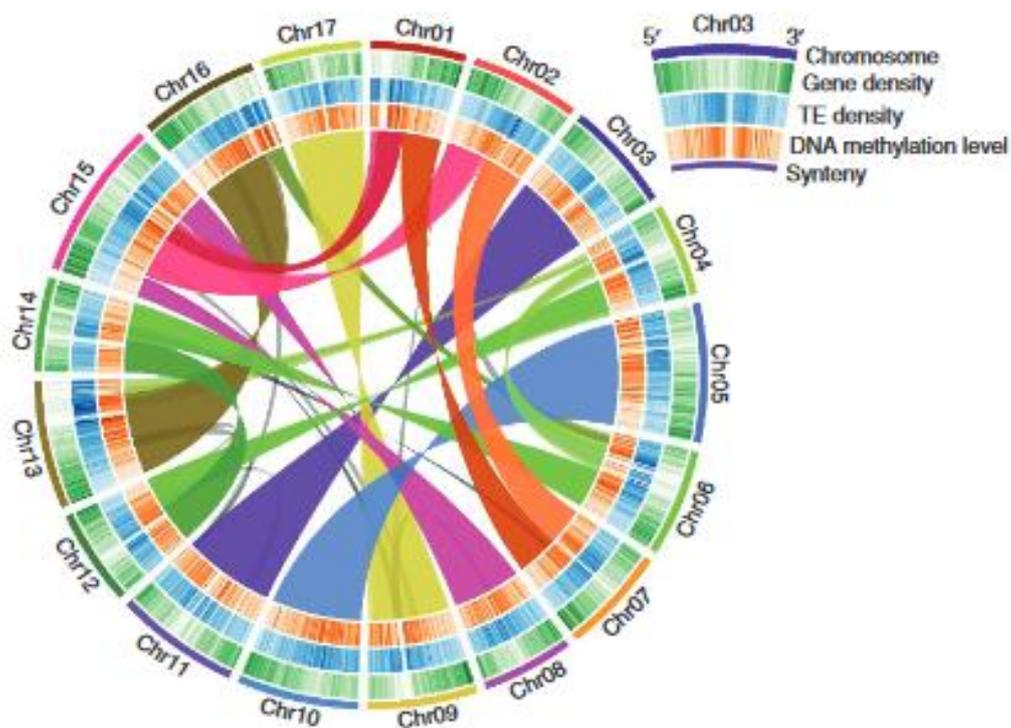


Figure 3 : Synthénie et distribution des caractéristiques génomiques et épigénomiques du génome du pommier (Daccord et al., 2017).

La taille du génome est de ~651 Mb comprenant 42 140 gènes annotés (Daccord et al., 2017). Malgré la sélection et le maintien des variétés par greffage, la diversité du génome du pommier domestique est très élevée avec en moyenne un taux d'hétérozygotie $H_e > 0,7$ et une forte occurrence de polymorphismes SNP (4,4 SNPs par kb, Velasco et al., 2010). Le système d'auto-incompatibilité gamétophytique, la diversité des progéniteurs durant la domestication, la durée de la spéciation, la durée de vie des pommiers et la sélection humaine empirique par pollinisation ouverte ont sans doute contribué à conserver des niveaux d'hétérozygotie importants dans l'ensemble de l'espèce (Gross et al., 2014). Urrestarazu et al., (2016) ont

exploré la structuration génétique d'environ 2400 variétés issues de 14 collections européennes et ont identifié une faible structuration liée à l'origine géographique des variétés. Lassois et al., (2016) ont aussi mis en avant une faible structure génétique dans les 2163 variétés issues de nombreuses collections d'origine française. Cette faible structuration est liée à l'usage (dessert vs cidre) et à la date de sélection (variété ancienne vs moderne) (**Figure 4**), mais elle traduit des flux de gènes très importants à l'échelle des pays, de l'Europe et du monde, liés à la capacité de transporter des greffons à grande distance (Urrestarazu et al., 2016).

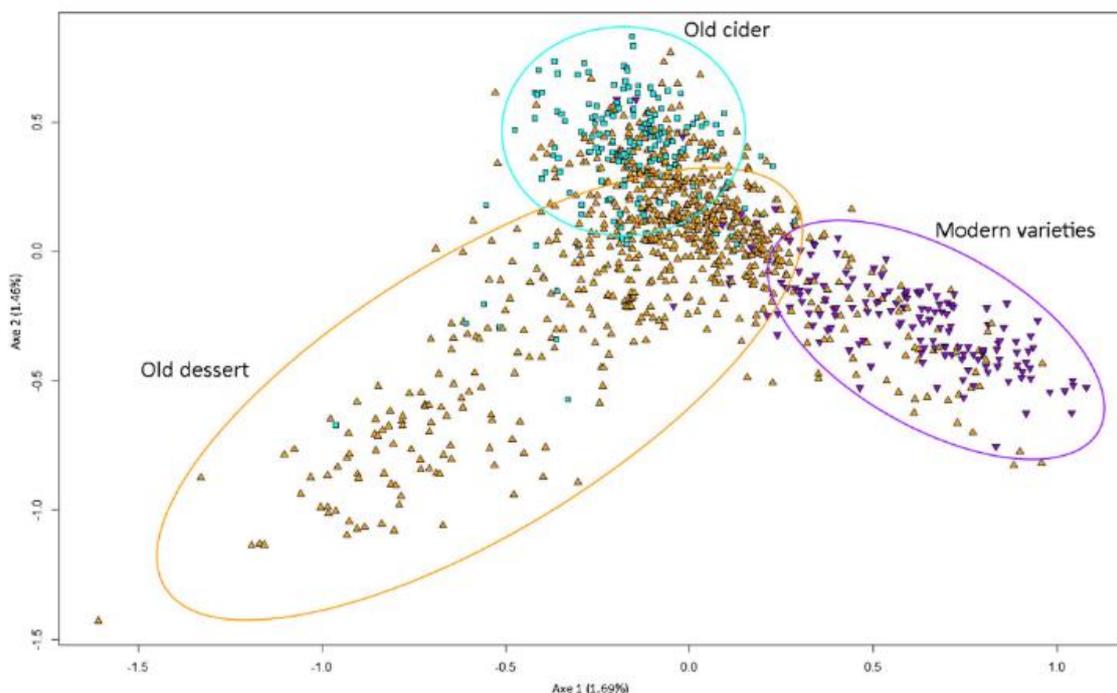


Figure 4 : Analyse factorielle des correspondances représentant la structure de 1084 génotypes de pommiers diploïdes (Lassois et al., 2016).

Une certaine diversité est observée dans les variétés plus récentes utilisées pour la production (Gross et al., 2014). La majorité des variétés modernes provient d'un processus de sélection basé sur un nombre limité de progéniteurs. Une étude récente sur les pedigrees menée par l'équipe illustre la forte interconnexion (nombreuses relations d'apparentement) entre les variétés anciennes européennes de pomme à couteau : certaines très vieilles variétés du XVIe ou XVIIe siècle occupent ainsi des places prédominantes en tant que variétés fondatrices de ces pedigrees comme les variétés 'Reinette Franche', 'Margil' et 'Alexander' (Muranty et al., 2020).

Ces études de diversité ont été possible grâce au développement d'outils de génotypage haut débit, en particulier les puces de génotypage SNP 8K (Chagné et al., 2012), 20K (Bianco et al., 2014) et 480K (Bianco et al., 2016). Les génomes de 27 variétés ont été reséquencés avec le développement de la puce 8K, de 14 fondateurs avec la puce 20K et de 67 autres variétés avec la puce 480K (Bianco et al., 2016). En 2018, le reséquençage de 35 variétés de pommier domestique supplémentaires a également été publié par Duan et al., (2017). L'accumulation de données sur les séquences de variétés de l'espèce *Malus domestica* permet de disséquer la complexité du génome du pommier et son évolution. Ces données sont également indispensables pour l'identification des déterminants génétiques de traits agronomiques.

Physiologie et culture

Le pommier est une plante pérenne cultivée en vergers. Les arbres sont généralement taillés pour atteindre une hauteur inférieure à 3m et ainsi faciliter les récoltes. L'éclaircissage des fleurs en fin de printemps ou des jeunes fruits après nouaison est également utilisé pour réguler la production et le calibre des fruits. Les mécanismes d'auto-incompatibilité empêchent l'autofécondation des variétés, la pollinisation est donc ouverte, avec l'aide de variétés pollinisatrices. Pour garantir l'identité variétale, la multiplication des pommiers se fait principalement par reproduction végétative et plus particulièrement par greffage. La culture par greffage apporte également d'autres avantages comme le contrôle de la vigueur des arbres, influencée par le porte-greffe (Webster et al., 2003). Comme la plupart des plantes ligneuses et pérennes, la phase juvénile des pommiers est longue ; elle dure en moyenne 4-8 ans avant la première floraison depuis le pépin (Pratt, 1990; Giraud et al., 2014). Le greffage permet de réduire le délai entre l'implantation et la production de fruits. Cependant dans le cadre de l'amélioration variétale, cette période juvénile augmente le temps de sélection des caractères d'intérêt sur le fruit. Pour la sélection de nouvelles variétés, il est donc intéressant d'identifier des marqueurs prédictifs des caractères agronomiques (productivité, traits organoleptiques, résistance, conservation, ...), sélectionnables avant le stade de production des fruits.

La pomme est l'un des fruits les plus produits au monde après la banane (**Figure 5-A**). En 2018, 86 millions de tonnes (Mt) de pommes ont été produites dans le monde dont 19Mt en Europe (FAOstat, 2018) et la production mondiale ne cesse de progresser (**Figure 5-B**).

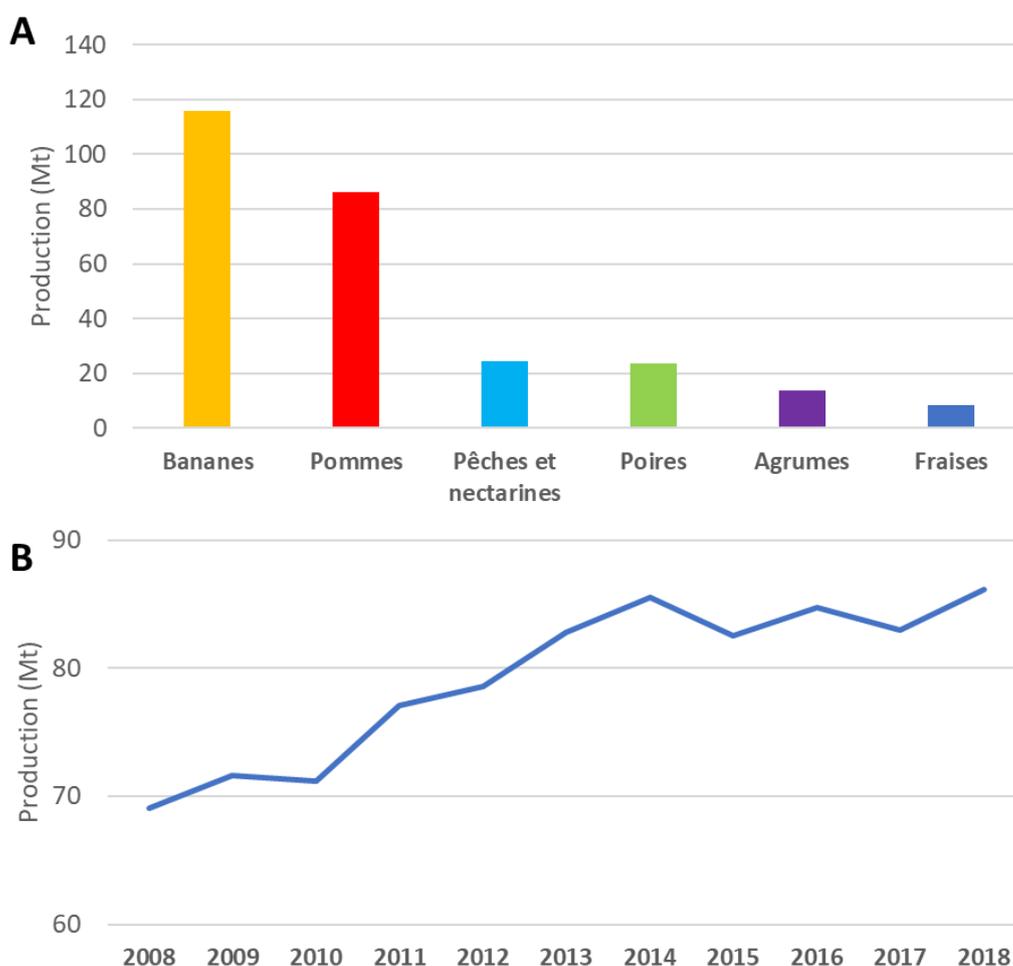


Figure 5 : (A) Rang et production de pommes dans le monde en 2018 (en millions de tonnes) parmi les fruits les plus produits. (B) Evolution de la production de pommes dans le monde entre 2008 et 2018. Les données sont issues de la base de données FAOstat.

La pomme est le fruit de table préféré des français avec une consommation d'environ 20kg par foyer et par an. C'est également le fruit le plus produit en France avec environ 1,55 Mt en 2019 (Agreste, 2019). A l'heure actuelle, 41 0000 ha sont consacrés à la pomiculture en France, dont 17% sont en Pays de la Loire (deuxième plus gros bassin de production derrière la région PACA, **Figure 6**) (Agreste, 2019). La France est le troisième pays producteur européen derrière l'Italie et la Pologne. Avec l'augmentation de la production en Europe, les exportations françaises sont en baisse. Le marché de l'exportation française est principalement tourné vers l'Europe avec Gala comme variété principale.

La pomme est commercialisée en tant que fruit frais ou comme produit transformé (cidre, compote et jus principalement). Elle représente un marché important dans l'économie agricole française (700 millions d'euros).

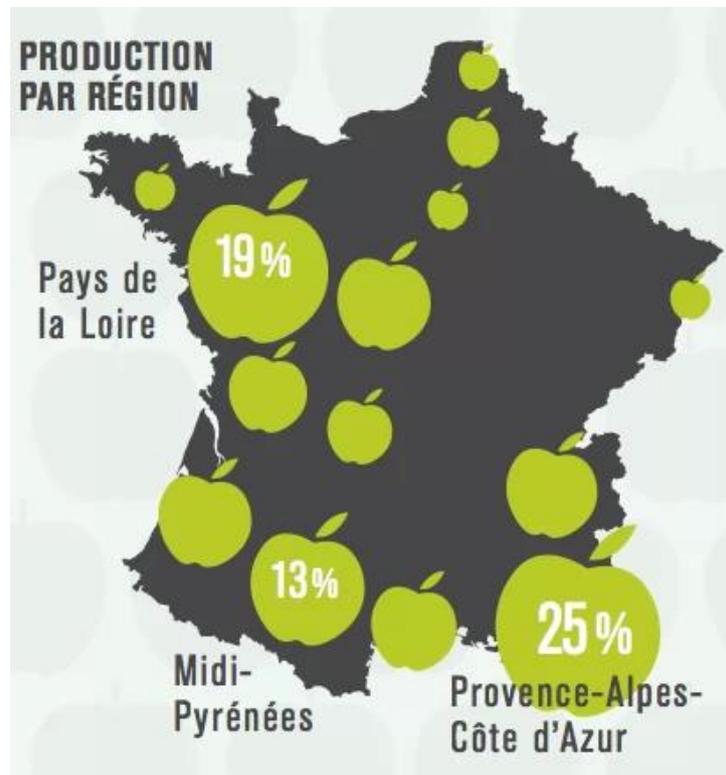


Figure 6 : Répartition géographique de la production française de pommes (source : Planetoscope).

Menaces biotiques

Les maladies liées à des agents pathogènes ou les dégâts causés par des ravageurs entravent la productivité de la filière. En effet, la majorité des variétés commercialisées actuellement est sensible, voire très sensible aux principales maladies et ravageurs du pommier, avec des conséquences sur l'esthétique du fruit comme les tâches de la tavelure et les trous laissés par les carpocapses ou un impact sur la santé des arbres comme le feu bactérien, le puceron et l'oïdium.

Il existe 3 catégories d'organismes pathogènes, classés en fonction de leur mode de vie et leur interaction avec l'hôte : les organismes **biotrophes** sont des parasites obligatoires. Ils se développent uniquement dans des tissus vivants de la plante (Mendgen and Hahn, 2002; Panstruga, 2003; Glazebrook, 2005). Ils infectent la plante sans provoquer de dommages

importants au niveau cellulaire pour minimiser les réactions de défense pendant plusieurs jours (Plotnikova and Ausubel, 2007). Les organismes **nécrotrophes**, à l'inverse, provoquent rapidement la nécrose des cellules infectées pour atteindre les ressources nutritives pour leur développement (Glazebrook, 2005; Plotnikova and Ausubel, 2007)(Glazebrook, 2005; Plotnikova and Ausubel, 2007). Ces organismes possèdent le plus fort pouvoir pathogène par rapport aux organismes biotrophes et hemi-biotrophes. Ils se développent dans des tissus nécrosés mais ce ne sont pas des organismes dits saprophytes, qui colonisent des tissus déjà morts avant l'infection (Mäkelä et al., 2014). Les organismes **hémibiotrophes** ont une phase précoce et transitoire de leur cycle de développement biotrophe et une autre partie nécrotrophe, souvent associée à la phase de reproduction (Perfect and Green, 2001).

La tavelure et le feu bactérien sont deux des maladies du pommier les plus dommageables ; elles ont été choisies comme modèles dans cette étude. Ces deux maladies provoquent des pertes importantes et interviennent au même stade de développement des pommiers (après la floraison) et dans des conditions climatiques similaires. Etudier ces deux maladies en parallèle est intéressant de par le contraste dans la biologie des agents pathogènes responsables et permet d'envisager le développement d'une lutte plus durable qui ciblerait ces deux maladies simultanément.

b- Le pommier - *Venturia inaequalis*

La tavelure du pommier est causée par le champignon ascomycète *Venturia inaequalis* Cooke Wint. (MacHardy, 1996). Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons *Vi* pour plus de simplicité.

Le cycle de vie de *Vi*, représenté en **Figure 7** est composé d'une étape parasitaire au printemps pendant laquelle il colonise les tissus du pommier et une étape saprophytique de latence dans les feuilles mortes en hiver. *Vi* est décrit comme un organisme hémibiotrophe car son cycle de vie parasitaire est divisé en une partie biotrophe dominante et une partie nécrotrophe (Bowen et al., 2011).

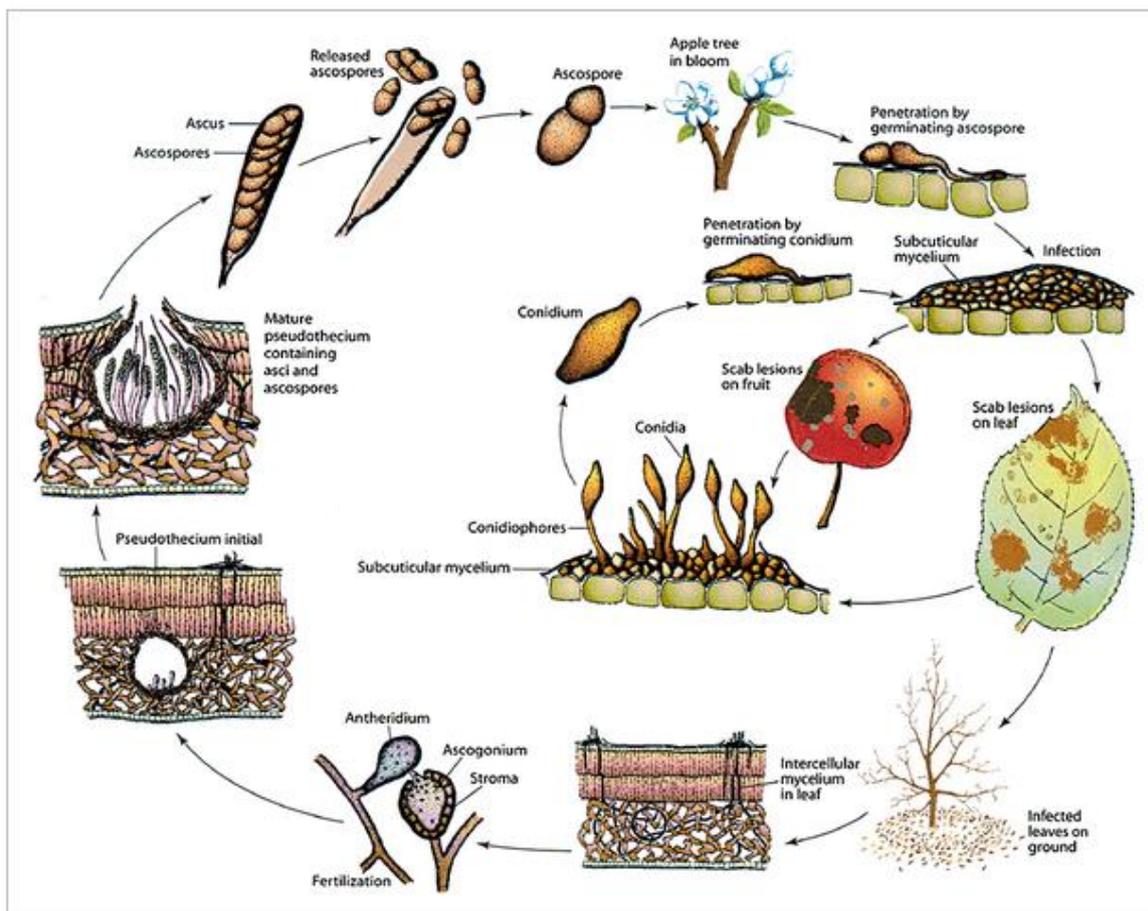


Figure 7 : Cycle de vie du champignon *Venturia inaequalis* (Bowen et al., 2011).

L'inoculum primaire de *Vi* provient de feuilles en décomposition. Le cycle de vie de *Vi* commence par une phase saprophytique pendant laquelle le champignon se développe grâce à la décomposition de matière organique. Le champignon survit et assure sa reproduction sexuée dans les tissus foliaires au pied des pommiers durant l'hiver. Les ascospores issues de cette reproduction et contenues dans des asques sont produites dans un organe de fructification appelé pseudothèce.

Au printemps, les pseudothèces terminent leur maturation et avec les premières pluies, les asques sont propulsés hors des feuilles et peuvent atteindre les jeunes pousses de l'année. Les ascospores sont alors disséminées et forment l'inoculum primaire. Les conditions de température et d'humidité au printemps dans les régions tempérées favorisent la germination des spores à la surface des jeunes feuilles en présence d'eau libre. Pour les feuilles plus âgées, une résistance ontogénique se met en place et empêche le développement de *Vi*. Des

hypothèses sur les mécanismes sous-jacents à cette résistance ontogénique ont été proposées (Zajicova et al., 2019) mais ceux-ci restent mal connus.

Au contact de l'eau libre, les ascospores se réhydratent et adhèrent à la cuticule via des molécules d'adhésion formant le mucilage adhésif. Puis ces spores germent et développent un tube germinatif (Schafer, 1994; Knogge, 1998; Meng et al., 2009). Le tube germinatif peut prendre la forme d'une structure d'infection, appelée appressorium (**Figure 8**) (Deising et al., 2000). Elle a pour rôle de faciliter l'entrée du champignon dans le tissu. Par pression mécanique et libération d'enzymes telles que les cutinases, l'appressorium va percer la cuticule (Horbach et al., 2011). Ces différentes étapes correspondent à la première étape de pénétration.

Lorsque la cuticule est percée, la « cheville de pénétration » se différencie et se développe en un réseau d'hyphes sous-cuticulaires (**Figure 8**). Les hyphes sont des longs filaments cellulaires qui se développent entre les cellules et la cuticule. Ils permettent la colonisation du milieu et assurent l'absorption de molécules pour la nutrition du champignon (Schafer, 1994; Meng et al., 2009). Contrairement à d'autres champignons, *Vi* ne forment pas d'haustoria pénétrant les cellules. A partir de ce réseau d'hyphes se différencient à intervalle régulier des structures composées de plusieurs couches cellulaires appelées stroma (Bowen et al., 2011). A ce stade, correspondant à la partie biotrophique du cycle de *Vi*, aucun symptôme de l'infection n'est visible. Le développement des organismes biotrophes repose sur le maintien de l'intégrité des tissus végétaux qu'ils colonisent. De ce fait, le développement de ces organismes dans la plante est souvent peu intrusif dans les premières étapes afin de limiter les réactions immunitaires aboutissant à la mort cellulaire.

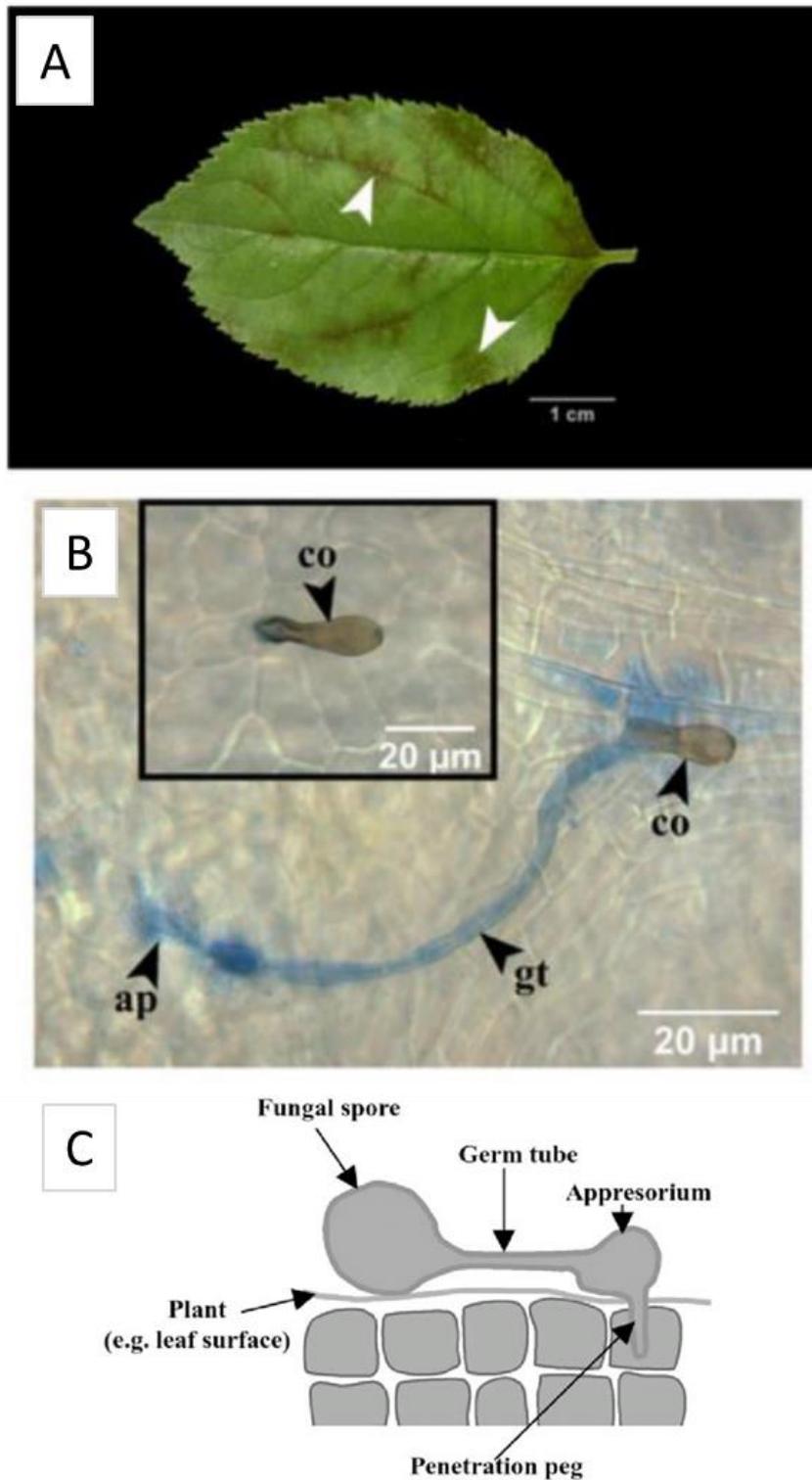


Figure 8 : Structures macroscopiques et microscopiques observées dans des génotypes après inoculation avec *Vi*. (A) Symptômes macroscopiques de tâches sporulantes sur feuille sensible, indiquées par les flèches blanches (B) Phénotypage microscopique du développement du tube germinatif (gt) et de l'appressorium (ap) à partir de la conidie (co). L'encadré noir illustre une conidie qui n'a pas germé. Adapté de Laloï et al., 2017 (C) Schéma des structures d'infection développées par les organismes fongiques lors de la pénétration dans les plantes hôtes (Abu-Elteen and Hamad, 2017).

Lorsque les conditions d'humidité et de température sont favorables, les cellules terminales du stroma peuvent débiter la conidiogénèse. Une étape de reproduction asexuée a lieu au niveau de ces cellules qui s'élargissent et aboutissent à la formation de structure spécialisée, appelée conidiophore (Bowen et al., 2011). Le développement de ces structures provoque la rupture de la cuticule. Ensuite, le processus de libération des conidies, autrement appelée sporulation (=inoculum secondaire), est stimulé par un ensemble de facteurs environnementaux et plante-dépendants (Su et al., 2012). Cette étape correspond à la partie nécrotrophe du cycle. Les premiers symptômes apparaissent sous la forme de tâches sporulantes illustrées dans la **Figure 8-A** (Bowen et al., 2011). Ces tâches se développent sur une large partie de la surface des feuilles des génotypes sensibles. La rupture de la cuticule provoque la déshydratation des tissus et donc l'apparition de nécroses. Les spores ainsi libérées vont être disséminées et atteindre les autres jeunes feuilles en développement, provoquant l'affaiblissement générale du pommier et des pertes de production importantes. Pour les variétés moins sensibles, même si le développement de la tavelure n'entraîne pas d'affaiblissement de l'arbre, elle peut provoquer des tâches localisées sur les pommes qui altèrent l'aspect esthétique de certains fruits. Le marché de la pomme est soumis à des calibres et codes esthétiques strictes. Malgré l'absence de toxicité du champignon pour la consommation humaine, les pommes tavelées ne peuvent pas être vendues en tant que fruits frais mais sont commercialisées pour l'industrie de transformation entraînant des pertes économiques importantes pour les producteurs.

Pour limiter les pertes économiques liées aux stress biotiques, des méthodes de protection ont été développées. Elles ont pour but de réduire l'inoculum (produits à effet biocide ou antagoniste, prophylaxie) ou d'augmenter la résistance (amélioration génétique ou application de stimulateurs de défense). Mais l'utilisation massive de traitements fongicides reste encore aujourd'hui la méthode la plus utilisée. L'indice de fréquence de traitements s'élève à 15-20 traitements par an pour la tavelure (Soufflet-Freslon et al., 2008; Bus et al., 2011). Pour optimiser les fréquences de traitement, des outils d'aide à la décision tel que RIMpro ont été développés pour prédire les risques de projection d'ascospores en se basant sur des données de conditions climatiques (<https://www.rimpro.eu/>).

c- Le pommier – *Erwinia amylovora*

L'agent pathogène responsable du feu bactérien est la bactérie Gram négative, *Erwinia amylovora* (nommée *Ea* par la suite) de la famille des Enterobactéries (Kraepiel and Barny, 2016). *Ea* est décrite comme un organisme hémibiotrophe car les tissus colonisés sont rapidement nécrosés, même si les populations bactériennes se développent dans les tissus vivants.

Les bactéries sont présentes dans l'environnement sous forme libre, généralement en biofilm, dans le sol ou l'eau ou en association avec une plante hôte. Il existe 4 groupes d'interaction plante-bactérie. Les populations bactériennes, capables de coloniser les zones d'interaction entre l'environnement et les végétaux, sont décrites comme **épiphytiques** s'il s'agit des parties aériennes de la plante ou **rhizosphériques** si elles sont présentes au niveau du système racinaire. Les bactéries **endophytes** sont capables de coloniser les tissus internes des plantes (Kumar et al., 2017). Et finalement, les bactéries **phytopathogènes** sont assimilées aux bactéries endophytes par leur capacité à coloniser les tissus mais se différencient par les symptômes qu'elles provoquent lors de l'infection.

En hiver les populations bactériennes sont en dormance dans les chancres et les rameaux des arbres infectés. Des gouttelettes d'exsudats, composées d'un mélange de sucres et de bactéries, sont sécrétées au niveau de ces organes et constituent la source d'inoculum primaire (**Figure 9**). Cet inoculum est transporté entre hôtes par des vecteurs (insectes, matériel de taille, oiseaux, vents ...)(Vanneste, 2000).

Au printemps, les insectes transportent ces populations d'un arbre à l'autre. Au contact des plantes, les bactéries pénètrent les tissus aériens par les ouvertures naturelles comme les nectaires des bourgeons floraux ou par les blessures (**Figure 9**).

Au sein des tissus en croissance, les populations bactériennes colonisent progressivement les espaces intercellulaires des parenchymes accompagnant les vaisseaux conducteurs et provoquent la mort cellulaire, générant des nécroses caractéristiques de cette maladie. Les pousses ceinturées flétrissent et se recourbent en crosse, autre caractéristique du feu bactérien (« Shepherd's crook » en anglais). Des exsudats sont sécrétés le long des pousses infectées et constituent une source d'inoculum secondaire (**Figure 9**).

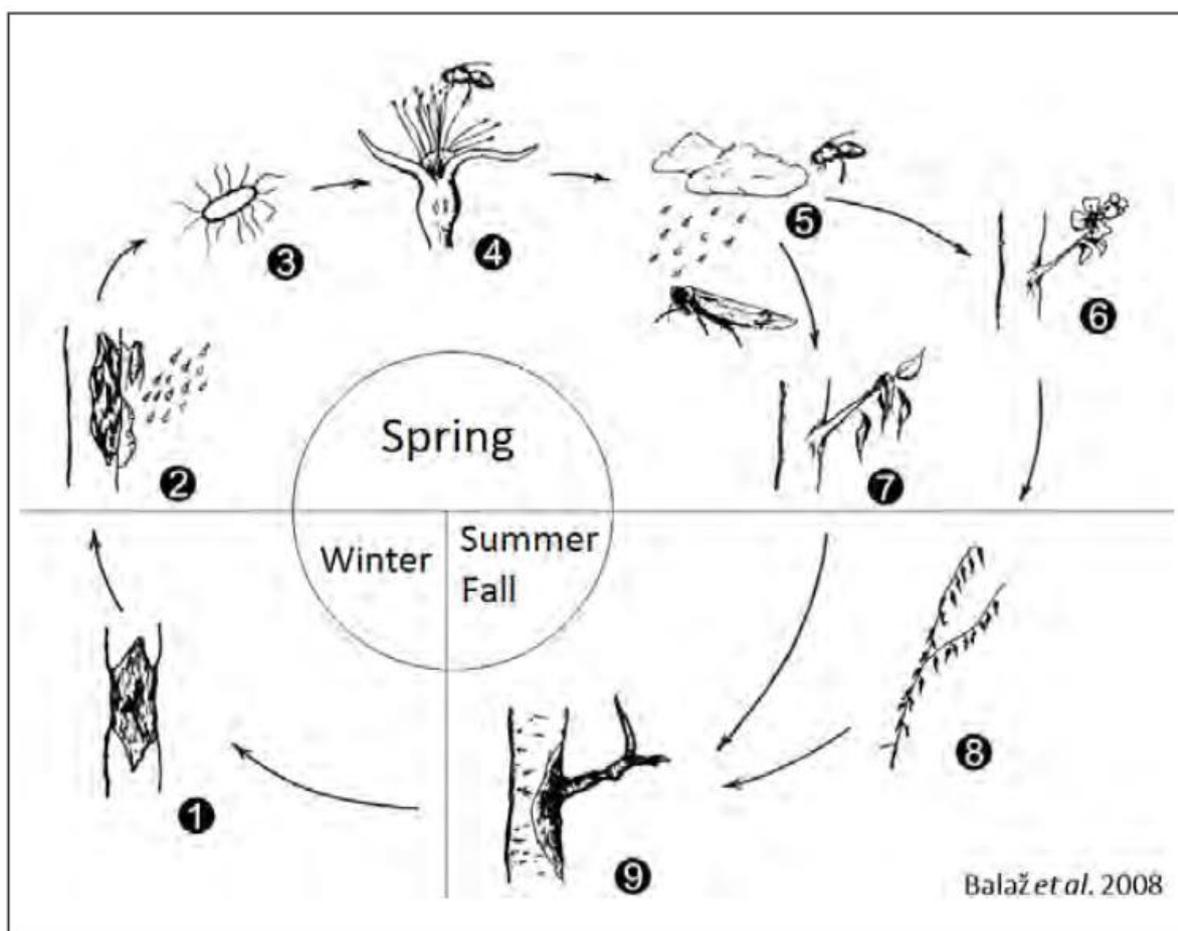


Figure 9 : Cycle de développement du feu bactérien : 1. Hivernage dans les chancre du bois en hiver. 2. Apparition des bactéries à la surface de l'écorce au niveau des chancres. 3. Dissémination des bactéries au niveau des fleurs par les insectes, la pluie et le vent. 4. Croissance des populations bactériennes dans les fleurs. 5. Propagation secondaire des bactéries vers les fleurs et les pousses. 6. Développement du feu bactérien au niveau des fleurs. 7. Développement du feu bactérien au niveau des pousses. 8. Mort des branches ou rameaux. 9. Formation de nouveaux chancres et hivernage.

La propagation systémique des populations bactériennes dans les variétés sensibles aboutit à la sénescence du rameau voire de l'arbre. Des chancres apparaissent également au niveau de l'écorce des arbres : ils permettent la conservation de la bactérie en hiver et sont source d'inoculum primaire au printemps. Les fruits des rameaux infectés ne se développent pas et les fruits infectés se nécrosent. Pendant longtemps, *Ea* était classée comme organisme de quarantaine imposant l'arrachage et l'assainissement des parcelles affectées à plus de 10%. Mais depuis 2019 la révision de la législation phytosanitaire de l'Union Européenne a pris effet

et *Ea* est désormais classée comme organisme réglementé non de quarantaine (ORNQ) ce qui implique une réglementation sur les végétaux destinés à la plantation et non plus sur la lutte en vergers comme les organismes de quarantaine (OQ) (règlement (UE) 2016/2031).

Pour limiter les pertes économiques liées au feu bactérien, il est recommandé d'éliminer les chancres, rameaux ou arbres infectés qui constituent une source d'inoculum aux différentes étapes du cycle. Des dispositions de désinfection sont prévues pour limiter les contaminations entre arbres par du matériel de taille. L'utilisation de variétés résistantes permet également de limiter les dégâts et la propagation de la maladie. Dans certains pays, l'utilisation d'antibiotiques est possible mais la réglementation interdit l'utilisation de ces produits en Europe.

2- Les résistances génétiques du pommier

L'utilisation de variétés résistantes est un des principaux leviers pour limiter le développement des maladies et l'utilisation massive de pesticides. Des méthodologies ont été développées pour identifier ces résistances et en comprendre les mécanismes. Un ensemble de gènes de résistance à effet majeur ou partiel ont été détectés chez le pommier vis-à-vis de la tavelure et du feu bactérien.

a- Méthodologie d'identification des résistances génétiques

Deux approches statistiques sont utilisées pour identifier les résistances génétiques : les approches de génétique de liaison et de génétique d'association. Le principe de ces deux méthodes est d'associer la variation d'un caractère phénotypique (qualitatif ou quantitatif) à une région génomique, on parle de cartographie (**Figure 10**). Cette cartographie passe par l'utilisation de l'information apportée par des marqueurs moléculaires. Ces méthodes consistent à tester pour chaque marqueur moléculaire ou groupe de marqueurs, la distribution d'un phénotype afin d'identifier des marqueurs dont les allèles sont liés à la variation du phénotype. Chaque marqueur est défini par une position génétique ou physique sur le génome qui permet d'identifier le locus contribuant à la variation phénotypique, appelé QTL (quantitative trait locus).

L'approche de génétique de liaison consiste à corrélérer la variation d'un phénotype avec le polymorphisme des marqueurs qui ségrègent dans une descendance issue d'un croisement contrôlé. La variation du phénotype est modélisée comme une combinaison de l'effet du génotype des marqueurs associés au phénotype et d'un effet résiduel ($P = M + e$). L'approche de génétique d'association (GWAS) consiste à corrélérer la variation d'un phénotype avec le polymorphisme de marqueurs dans une large population où l'apparentement n'est pas nécessairement contrôlé (ex. collection de ressources génétiques). La variation du phénotype est modélisée comme une combinaison de l'effet du génotype des marqueurs associés, des liens de parenté entre les génotypes estimés grâce aux marqueurs, éventuellement de la structuration génétique de la population et d'un effet résiduel ($P = M + A + S + e$).

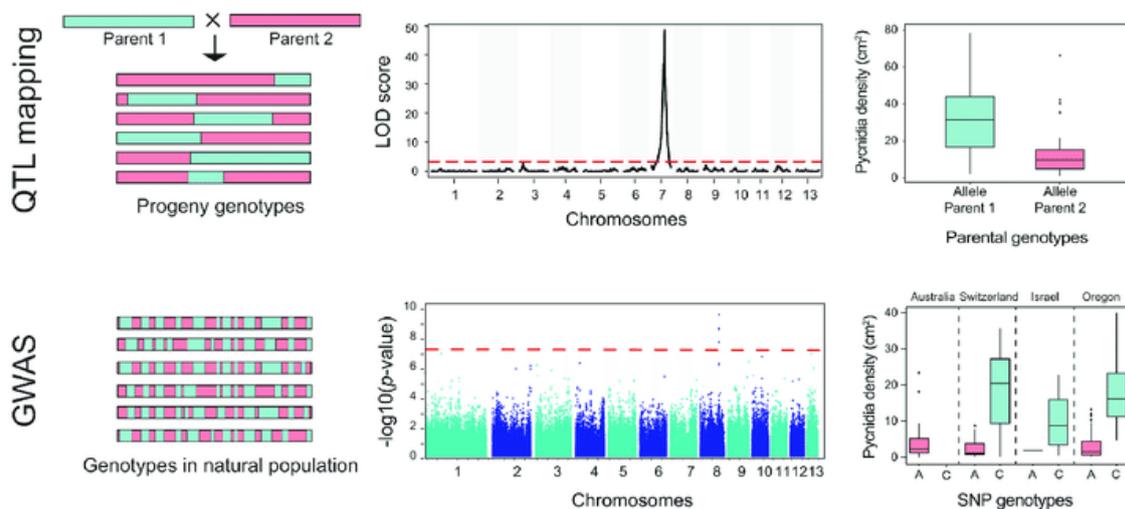


Figure 10 : Comparaison entre les approches de génétique de liaison (QTL mapping) et de génétique d'association (GWAS) pour la détection de Plissonneau et al., (2017).

Chez le pommier les détections de QTLs par génétique de liaison sont réalisées sur des descendance F1 en ségrégation puisque le pommier est une espèce allogame. Les allèles des marqueurs ne sont pas fixés comme une descendance F2 classiquement utilisée pour la détection. Il est donc nécessaire de trier le polymorphisme des marqueurs selon l'origine parentale. Deux cartes génétiques sont construites, une carte femelle composée des marqueurs variants dans ce parent, codés 'ab x aa', et une carte mâle composée des marqueurs 'aa x ab'. Les marqueurs variants chez les deux parents, codés 'ab x ab' peuvent être utilisés comme marqueurs ponts pour créer une carte intégrée issue de la fusion des deux

cartes parentales. Exceptée cette spécificité, des modèles statistiques « classiques » sont déployés pour la détection de QTL (par liaison ou association) chez le pommier.

b- Les résistances qualitatives et quantitatives

Les plantes ont acquis des mécanismes de résistances complexes face aux agents pathogènes. La réponse immunitaire des plantes est caractérisée pas trois grands mécanismes (Jones and Dangl, 2006; Andersen et al., 2018) : La perception de l'agent pathogène, la transduction du signal et la mise en place de défenses.

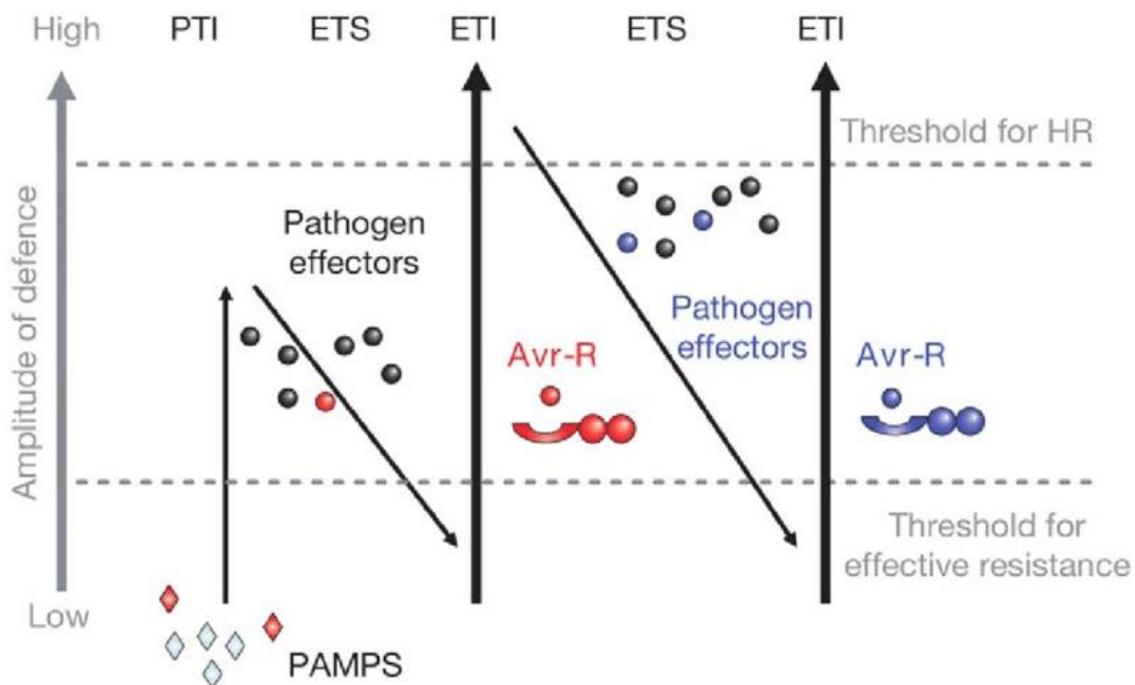


Figure 11 : Modèle Zig-Zag proposé par Jones and Dangl, (2006) pour schématiser la réponse immunitaire des plantes lors d'une interaction avec un agent pathogène. PTI: PAMPs-Triggered Immunity, ETS: Effector-Triggered Susceptibility, ETI: Effectors-Triggered Immunity, PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns, Avr: Avirulence gene, R: Resistance gene, HR: Hypersensitive response.

Dans leur modèle ZigZag (**Figure 11**), Jones et Dangl schématisent la succession des étapes de mise en place des résistances (Jones and Dangl, 2006). Lors d'une attaque, les agents pathogènes produisent des molécules appelées PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns). Ces molécules sont perçues par la plante grâce à des récepteurs, appelés PRR

(Pattern recognition receptors) (Flor, 1971). La reconnaissance d'un PAMP par ce récepteur induit une cascade de signalisation cellulaire qui induit une reprogrammation cellulaire avec l'activation de facteurs de transcription et de modulateurs épigénétiques et ainsi l'expression de gènes impliqués dans la résistance. L'ensemble de ce processus est appelé PTI (PAMPs triggered immunity) dans le model ZigZag. Dans certains cas, des molécules produites par l'agent pathogène, appelées effecteurs, contournent et interfèrent avec la première réaction de défense PTI. Si ces effecteurs sont reconnus par des récepteurs cellulaires, une nouvelle vague de signalisation et de défense est mise en place, appelée ETI (Effectors triggered immunity).

Les approches de génétiques de liaison et d'association précédemment décrites permettent de détecter deux types de résistances dépendantes de la distribution du phénotype de résistance : les résistances qualitatives et quantitatives.

Les résistances qualitatives représentent la résistance totale d'une plante à un agent pathogène apportée par un gène majeur de résistance, appelé « R gene ». Cette reconnaissance est décrite par le concept gène-pour-gène de Flor, (1971). Les résistances qualitatives se traduisent par une distribution discontinue entre plantes résistantes et sensibles (**Figure 12** - A). D'un point de vue fonctionnel, ces gènes majeurs de résistances sont souvent des récepteurs (R) qui reconnaissent des gènes d'avirulence de l'agent pathogène (Avr) et induisent l'ETI (**Figure 11** - ETI et **Figure 12** – B), souvent caractérisée par une réponse hypersensible qui empêche l'infection (Amarante-Mendes et al., 2018).

A la différence des résistances qualitatives, les résistances quantitatives se traduisent par une distribution continue des plantes sensibles à résistantes (**Figure 12**). Elles sont souvent phénotypiquement incomplètes et sont basées sur l'effet combiné de plusieurs gènes, chacun contribuant quantitativement au niveau de défense de la plante et correspondant donc à des QTLs de résistance (Niks et al., 2015). Les QTLs sont définis statistiquement par des régions génomiques qui confèrent chacune une résistance partielle à la plante. Dans ce cas, les QTLs peuvent être des gènes majeurs à effet réduit ce qui pourrait correspondre à des récepteurs PRR dont la réponse PTI est partiellement contournée par les effecteurs de l'agent pathogène (**Figure 11** – ETS) ou bien des gènes impliqués dans la transduction du signal ou la mise en place de défenses (Poland et al., 2009; Niks et al., 2015).

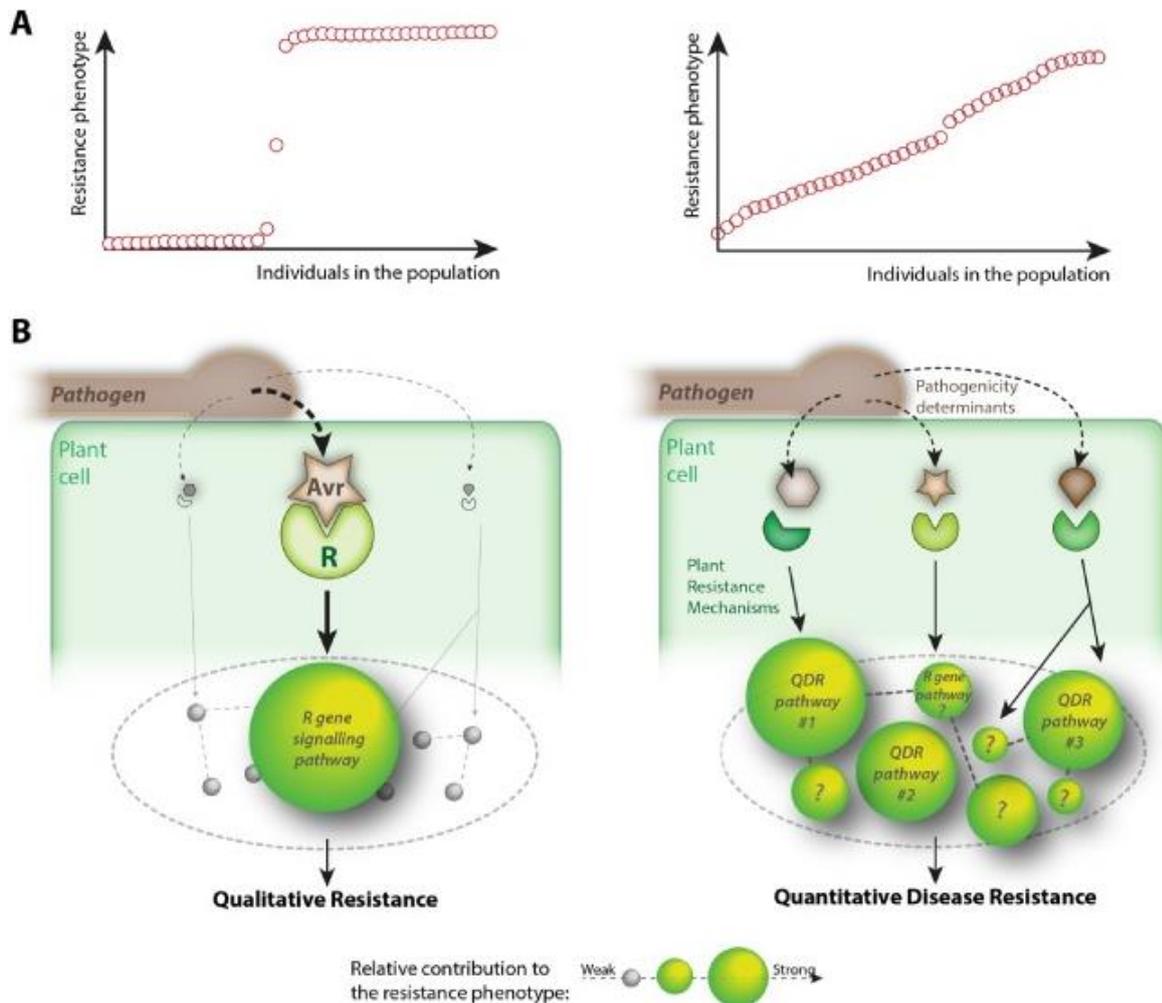


Figure 12 : La dualité de la résistance qualitative-quantitative aux maladies des plantes du point de vue de la biologie des populations et de la biologie moléculaire. La figure illustre la nature qualitative (panneaux de gauche) et quantitative (panneaux de droite) de la résistance. Du point de vue de la biologie des populations (A), le phénotype de résistance aux maladies suit une distribution binaire "sensible ou résistance" pour la résistance qualitative, mais une distribution continue de la sensibilité à la résistance pour la résistance quantitative. Du point de vue de la biologie moléculaire (B), la résistance qualitative résulte de la perception d'un seul effecteur (Avr) de l'agent pathogène par un gène de résistance des plantes (R), tandis que la résistance quantitative résulte de l'intégration de plusieurs voies de perception activées simultanément, chacune ayant une contribution relativement mineure au phénotype global de résistance. QDR : Quantitative disease resistance (Roux et al., 2014).

c- Les gènes majeurs et QTLs du pommier

L'avènement de la biologie moléculaire et les approches de cartographie génétique ont permis d'acquérir des connaissances sur le déterminisme génétique des résistances du pommier. Ainsi, chez le pommier 18 gènes majeurs (Gessler et al., 2006; Soufflet-Freslon et al., 2008; Bus et al., 2011; Madhuri et al., 2014) et 11 QTLs (Durel et al., 2003; Calenge et al., 2004; Soufflet-Freslon et al., 2008) ont été mis en évidence jusqu'à présent pour la résistance

à la tavelure ainsi que 1 gène majeur (Wöhner et al., 2018) et 7 QTLs (Calenge et al., 2005; Khan et al., 2006; Durel et al., 2009; Le Roux et al., 2010; Emeriewen et al., 2017; van de Weg et al., 2018) pour la résistance au feu bactérien. L'organisation génomique globale de ces gènes majeurs et QTLs est représentée schématiquement pour la tavelure et le feu bactérien en **Figure 13** et **Figure 14** respectivement.

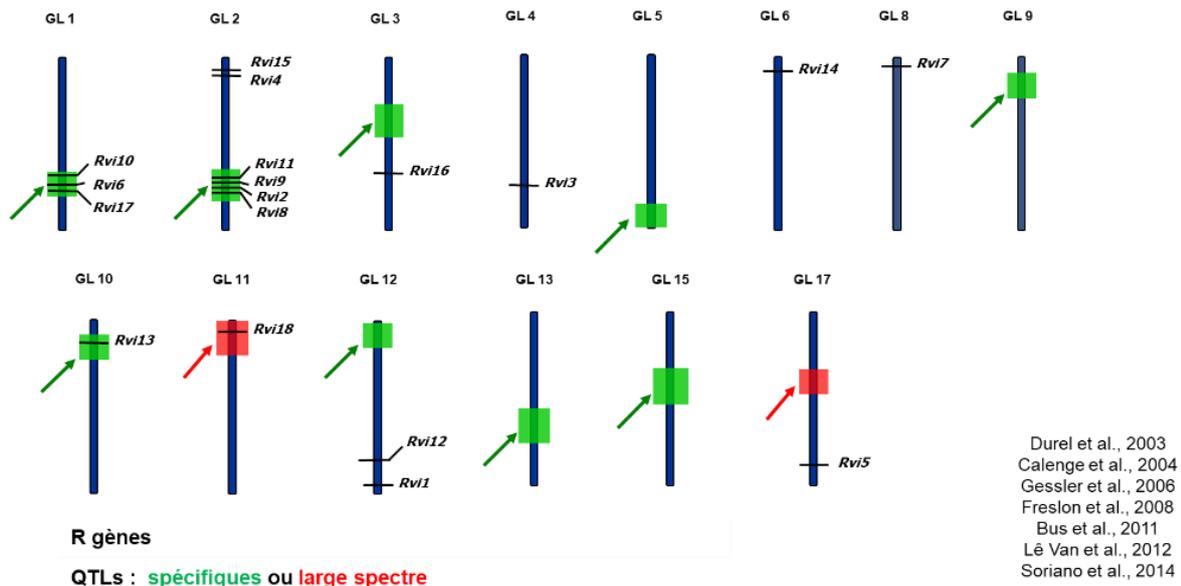


Figure 13 : Carte génétique représentant schématiquement la localisation et les caractéristiques des gènes majeurs et QTLs de résistance à la tavelure.

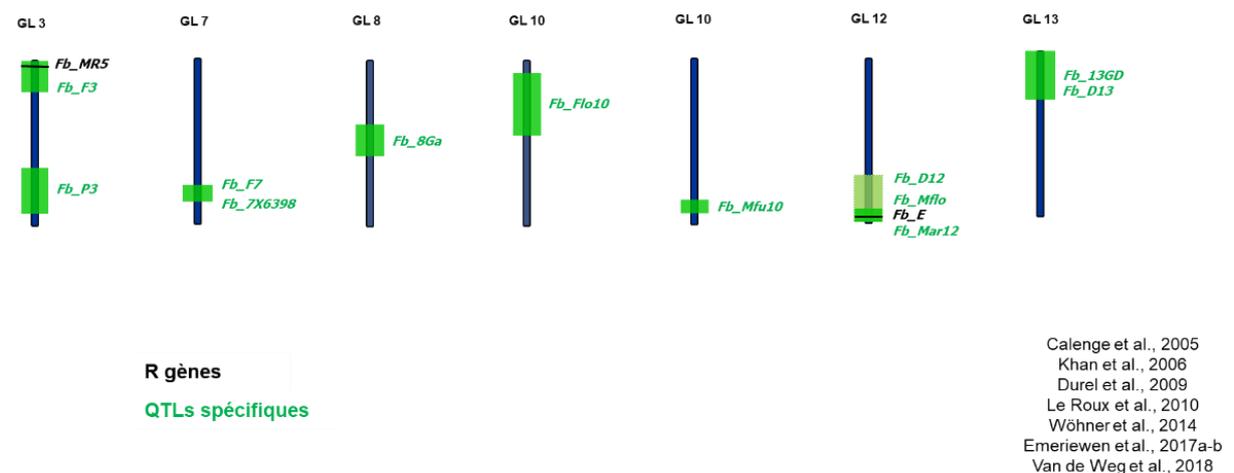


Figure 14 : Carte génétique représentant schématiquement la localisation et les caractéristiques des gènes majeurs et QTLs de résistance au feu bactérien.

d- Les mécanismes connus de la résistance ?

Les mécanismes impliqués dans les gènes majeurs et les QTLs de résistance à la tavelure et au feu bactérien sont pour la majorité indéterminés. Des études fonctionnelles ont permis de comprendre les mécanismes impliqués dans deux des gènes majeurs de résistance à la tavelure et un gène de résistance au feu bactérien.

Rvi6/Vf (tavelure) : Le premier gène qui a été cloné est le gène majeur de résistance à la tavelure *Rvi6*. Ce gène a été détecté dans la variété *Malus floribunda* 821. Dans la région du gène majeur, un cluster de quatre gènes *Hcrvf1* (*Vfa1*), *Hcrvf2* (*Vfa2*), *Hcrvf3* (*Vfa3*) et *Hcrvf4* (*Vfa4*) a été identifié. Parmi ces quatre gènes, seul *Hcrvf3* n'a pas de séquence fonctionnelle (Xu and Korban, 2002). Belfanti et al., (2004) ont montré que la transformation de la variété sensible Gala avec le gène *Hcrvf2* permet d'acquérir un phénotype de résistance totale par rapport à la majorité des souches (sauf les souches de race (6) qui contourne ce gène, Jha et al., 2009). Le gène *Hcrvf1* conférerait une résistance partielle et le gène *Hcrvf4* n'apporterait pas de résistance (Malnoy et al., 2008). Des analyses fonctionnelles complémentaires ont été menées en 2011 (Joshi et al., 2011) sur les deux gènes candidats *Hcrvf1* et *Hcrvf2*. Les résultats de cette étude confirment que la résistance du gène majeur *Rvi6* coïncide avec le profil d'expression du gène *Hcrvf2*. L'homologie de séquence entre ce gène et le gène de résistance *Cf* (*Cladosporium fulvum*) de la tomate a permis de déduire que le gène *Hcrvf2* code certainement une protéine composée d'un domaine extracellulaire riche en leucine répété (LRR) avec un domaine transmembranaire (TM) (Xu and Korban, 2002) mais sans domaine kinase comme les NBS-LRR. L'ensemble des éléments indiquent que cette protéine est un récepteur de type LRR qui serait donc probablement impliqué dans la reconnaissance des éliciteurs spécifiques de *Vi* et l'initiation de la transduction du signal d'infection par interaction avec d'autres protéines de type kinases (Belfanti et al., 2004; Paris et al., 2009).

Rvi15/Vr2 (tavelure) : Le gène majeur de résistance *Rvi15* a été détecté en 2004 dans le génotype GMAL 2473 (Patocchi et al., 2004). En 2010, Galli et al., (2010) réduisent l'intervalle de confiance et identifient 3 gènes candidats. Des études de transformation de la variété Gala avec des constructions des trois gènes candidats ont été menées par Schouten et al., (2014). Les résultats de cette étude montrent que le gène *Vr2-C* (un des trois candidats) correspond à la résistance du gène majeur *Rvi15*. Le gène *Vr2-C* code pour une protéine de la famille des

TIR-NBS-LRR (toll and mammalian interleukin-1 receptor protein nucleotide-binding site leucine-rich repeat ; Galli et al., 2010). Ce gène serait impliqué dans la reconnaissance d'un effecteur qui supprimerait les défenses mises en place dans la plante (Schouten et al., 2014).

Fb-Mr5 (feu bactérien) : La seule étude fonctionnelle qui a été réalisée sur un gène majeur de résistance au feu bactérien concerne le gène *Fb-Mr5*. La transformation de la variété sensible Gala avec la séquence de ce gène a permis de rétablir un phénotype de résistance à *Ea* (Broggini et al., 2014). Le gène *Fb-Mr5* a été détecté dans le génotype *Malus × robusta* 5 (Peil et al., 2007; Fahrenttrapp et al., 2013) et code pour une protéine décrite comme CC-NBS-LRR. Ce gène serait impliqué dans la reconnaissance de l'effecteur *avrRpt2_{EA}* d'*Ea*.

D'autres gènes majeurs importants pour la résistance à *Ea*, comme *Fb-E* (Parravicini et al., 2011) and *Fb-Mfu10* (Emeriewen et al., 2018) ont été caractérisés mais n'ont pas encore été validés par des études fonctionnelles.

La validation fonctionnelle de gènes impliqués dans la résistance n'est pas toujours possible, soit parce que les intervalles de confiance des régions génomiques impliquées sont encore trop larges pour réduire significativement le nombre de candidats, soit parce que la transformation de pommier avec certains des gènes candidats s'avère impossible. Pour étudier les mécanismes impliqués dans la résistance à la tavelure et au feu bactérien, d'autres approches ont été utilisées comme la comparaison du transcriptome (Kamber et al., 2016), protéome (Holtappels et al., 2018) ou métabolome (Sarkate et al., 2018) après une infection et/ou entre des variétés sensibles et résistantes (Norelli et al., 2009; Baldo et al., 2010).

La réponse HR, souvent impliquée dans les gènes majeurs de résistance et certains QTLs et à l'origine de symptômes de nécroses, est associée à la production de formes actives d'oxygène, de métabolites de défense comme les composés phloretins, biphenyls, dibenzofurans et d'autres composés phénoliques (Nicholson, 1973; Win et al., 2003; Petkovsek et al., 2011). L'hydrolyse de la phloridzin en phloretin induite par *Vi* serait impliquée dans la mise en place de défense et la suppression de la croissance de *Vi* (Mansoor et al., 2020). L'expression différentielle de gènes impliqués dans la résistance a été explorée notamment dans deux études (Degenhardt et al., 2005; Laloi, 2016) qui mettent en évidence la surexpression de plusieurs des gènes comme PAL et CHS (impliqués dans les voies de synthèse de ces composés) dans les génotypes résistants lors d'une infection par *Vi*. D'autres gènes impliqués dans la

signalisation, le métabolisme secondaire ou encore dans les modifications pariétales sont également sur-exprimés dans les génotypes résistants après une infection. Cependant, les liens de cause à effet entre les gènes sur-exprimés identifiés et les mécanismes de résistance sont encore incertains. Globalement, les voies des polyphénols et des flavonoïdes ont été mises en évidence dans la résistance à *Vi* (Mansoor et al., 2020) mais aussi à *Ea* (Gaucher et al., 2013).

La pathogénicité de *Ea* est principalement associée au système de sécrétion de type III (T3SS) qui permet d'injecter un ensemble de protéines dans les cellules des plantes (Oh and Beer, 2005), désigné à l'origine comme le système Hrp (hypersensitive reaction and pathogenicity) car indispensable à la fois à une réponse hypersensible sur plante non hôte et à la maladie sur plante hôte (Barney et al., 1990). Par le biais des effecteurs injectés, *Ea* provoque la mort cellulaire et la suppression de défenses, enrichissant l'apoplaste pour constituer un milieu favorable à son développement. Une des hypothèses de la résistance des génotypes à *Ea* est donc liée à la suppression de l'activité de ce système. Des études ont donc été menées sur les molécules différenciellement accumulées dans les cellules après une infection avec des souches virulentes ou avirulentes pour comprendre les mécanismes de la pathogénicité liés à ce système (Venisse et al., 2002; Pontais et al., 2008; Gaucher et al., 2013; Holtappels et al., 2015, 2016, 2018). D'autres études ont mis en évidence des gènes ou molécules différenciellement accumulées dans les génotypes résistants comme des protéines PR (Ziadi et al., 2001; Bonasera et al., 2006; Dugé de Bernonville et al., 2014; Marolleau et al., 2017), des gènes impliqués dans le stress oxydant ou la tolérance à la déshydratation (Norelli et al., 2009).

Un grand nombre d'études ont donc été menées pour comprendre les résistances à *Vi* et *Ea* et ont permis de mettre en avant certaines voies de défense mais la plupart des mécanismes restent encore indéterminés.

e- La sélection de nouvelles variétés : vers la SAM ?

Le schéma en **Figure 15** représente le processus de sélection des nouvelles variétés de pommier mené en partenariat entre INRAE et l'association de pépiniéristes français NOVADI (<https://cepinnovation-novadi.com/novadi/>). Les variétés sont sélectionnées sur des critères

de qualité agronomique (rendement, régularité de production, résistance aux bioagresseurs ...), de qualité organoleptique (goût, texture, couleur, ...) et de qualité commerciale (conservation, aspect extérieur du fruit ...). Le cycle de sélection des nouvelles variétés repose principalement sur des évaluations phénotypiques qui prennent de nombreuses années. En général, il faut environ 10 ans pour la sélection et 20 ans entre le croisement contrôlé générant les pépins et semis évalués et l'inscription au Catalogue Officiel des variétés. L'utilisation de marqueurs moléculaires pour prédire les caractères d'intérêt dans les descendants est encore très peu mise en œuvre à l'échelle française et internationale, mais de fortes évolutions sont en cours (Peace, 2017; Peace et al., 2019; Wannemuehler et al., 2019). Les informations sur les déterminants génétiques de la résistance peuvent être utilisées à la fois pour la sélection des semis au stade précoce et pour le choix des progéniteurs pour les croisements initiaux. A l'INRAE, ces deux aspects sont déjà initiés. Pour continuer à réduire les délais des cycles de sélection, il est nécessaire de développer des méthodes de prédiction génomique et de sélection assistée par marqueur (SAM) pour un maximum de caractères-cibles de la sélection (Muranty et al., 2015; Roth et al., 2020).

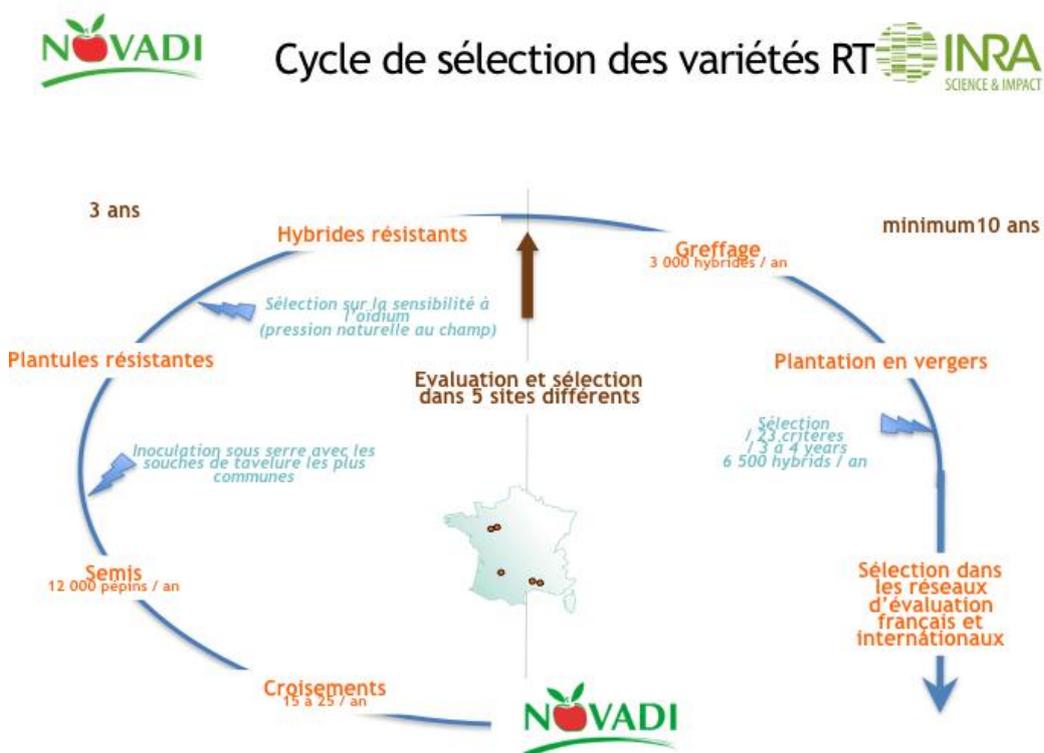


Figure 15 : Schéma du cycle de sélection des nouvelles variétés de pommier menée en partenariat entre INRAE et l'association de pépiniéristes français NOVADI. (<https://cepinnovation-novadi.com/novadi/>)

La SAM est une approche qui consiste à sélectionner des variétés pour des caractères d'intérêt à partir de données de marqueurs moléculaires. Cette méthode permet de prédire la présence ou l'absence d'un caractère indirectement d'après l'allèle du marqueur moléculaire associé (en déséquilibre de liaison). En choisissant des marqueurs aux bornes de l'intervalle de confiance d'un QTL, il est alors possible de prédire dans les descendants ceux qui ont intégré la version allélique résistante, sensible ou s'il y a eu des événements de recombinaison dans la zone. Il devient alors possible de prédire les caractères des descendants sans évaluation phénotypique et donc de trier rapidement les descendants qui ont intégré le QTL. Cette méthode permet de gagner un temps de sélection considérable mais elle nécessite des connaissances précises sur les déterminants génétiques à l'origine des caractères que l'on souhaite sélectionner.

f- Le contournement des résistances génétiques

Les résistances génétiques sont considérées comme un levier majeur. En effet, le déploiement des variétés résistantes réduit efficacement les maladies aux vergers (Didelot et al., 2016). La sélection de nouvelles variétés résistantes est très active dans la plupart des espèces cultivées. Au cours des dernières décennies, les variétés de pommier portant le gène *Rvi6* ont été déployées en vergers commerciaux : Florina, Ariane, Topaz, Goldrush® Coop38, Chouquette® Dalinette, Juliet® Coop43, Story® Inored, Opal, Crimson Crisp® Coop 39. Cependant, les gènes de résistance exercent des pressions de sélection sur les agents pathogènes, déclenchant leur évolution (McDonald and Linde, 2002). Le déploiement du gène majeur *Rvi6* dans la majorité des nouvelles variétés a abouti au contournement de cette résistance en Europe (Bengtsson, 2000; Parisi et al., 2004; Lefrancq and Lateur, 2009) et en Amérique (Beckerman et al., 2009; Papp et al., 2020).

Aujourd'hui, la plupart des gènes majeurs de résistance à la tavelure sont contournés par une souche. Le projet Vinqest (Patocchi et al., 2020) initié en 2009 a pour objectif le référencement de tous les contournements observés. Les résultats de ce projet montrent que les gènes *Rvi1*, *Rvi3*, and *Rvi8* sont « fréquemment contournés », les gènes *Rvi6*, *Rvi7*, and *Rvi10* sont « parfois contournés », les gènes *Rvi2*, *Rvi4*, *Rvi5*, *Rvi9*, *Rvi12*, *Rvi13* et *Rvi14* sont « rarement contournés » et enfin pour les gènes *Rvi11* et *Rvi15*, aucun contournement n'a été observé jusqu'à présent.

La résistance quantitative est considérée comme une résistance plus durable que celle des gènes majeurs de résistance (Parlevliet, 2002). La pression de sélection exercée sur les populations d'agents pathogènes par les QTLs est plus faible, puisque chaque QTL confère une résistance partielle. Par ailleurs, la résistance quantitative résulte généralement de l'effet associé de plusieurs QTLs pouvant actionner des mécanismes différents et complémentaires, ce qui rendrait le contournement par les populations pathogènes plus difficile comparativement à l'interaction gène-pour-gène d'un simple gène majeur. Cependant l'érosion de plusieurs QTLs de résistance à la tavelure a déjà été démontrée, en particulier pour les QTLs qT1 (Caffier et al., 2016), qF11 et qF17 (Caffier et al., 2014) même si ces phénomènes restent moins fréquents.

La diversification et le pyramidage de gènes majeurs et/ou QTLs de résistance en vergers sont donc considérés comme l'alternative la plus durable pour la protection des plantes (Laloi et al., 2017; Pilet-Nayel et al., 2017), même si elle n'est pas systématiquement efficace comme dans le cas de l'association 'Rvi6 + QTLs' (Lasserre-Zuber et al., 2018). La connaissance du déterminisme génétique des résistances et surtout des mécanismes déclenchés ou modulés par les gènes majeurs et les QTLs est donc essentielle pour augmenter l'efficacité des résistances génétiques en vergers et identifier les meilleures combinaisons lors des processus de sélection (Laloi et al., 2017).

3- Les stimulateurs de défense des plantes étudiés sur le pommier

L'utilisation de stimulateurs de défense des plantes (SDP) constitue un autre levier prometteur pour limiter le développement des maladies et l'utilisation massive de pesticides. De nombreuses études ont été menées dans l'équipe pour évaluer ces produits et en comprendre les mécanismes (Brisset et al., 2000; Dugé de Bernonville et al., 2014; Marolleau et al., 2017; Warneys et al., 2018). Quatre SDP ont été identifiés comme efficaces vis-à-vis de la tavelure et du feu bactérien chez le pommier.

a- Principe des stimulateurs de défense des plantes

Les SDP ou éliciteurs ou encore inducteurs de résistance recouvrent une large gamme de produits de synthèse (Bektas and Eulgem, 2015) ou extraits biologiques d'origine variée (Wiesel et al., 2014) ou encore microorganismes vivants non pathogènes. Les SDP sont des produits « capables d'induire (ou de préparer à l'induction), chez les plantes traitées, un état de résistance aux bio-agresseurs » (<https://ecophytopic.fr/>). A la différence des pesticides classiquement utilisés en vergers qui ciblent les agents pathogènes, les SDP n'ont pas d'effet biocide (Oostendorp et al., 2001; Oliveira et al., 2016). Les molécules actives de ces produits sont perçues par la plante comme un signal d'infection et activent un réseau de défenses dans la plante traitée (Thakur and Sohal, 2013). Pour mimer le signal d'infection chez les plantes, deux principales stratégies ont été développées :

- Eliciteurs généraux : le principe actif du SDP mime un PAMP, un MAMP ou un DAMP. Les récepteurs, présents dans les cellules, reconnaissent les SDP comme des éléments d'une infection et déclenche la PTI (Jones and Dangl, 2006). Un ensemble de défenses est déclenché en amont d'un contact potentiel avec un agent pathogène ce qui permet de limiter le temps de latence entre la reconnaissance et l'activation des défenses (Andersen et al., 2018). Ces éliciteurs sont par exemple la chitin, la laminarine ou encore le COS-OGA.
- Analogues hormonaux : La molécule active du SDP agit directement sur la modulation de voies de signalisation hormonale. Cette activation a la même conséquence que la stratégie précédente c'est-à-dire la mise en place précoce de défenses (Andersen et al., 2018). Ces éliciteurs sont par exemple l'ASM (ou BTH), l'INA ou le BABA.

L'évaluation du potentiel de composés SDP passe par des tests d'efficacité en conditions contrôlées et aux champs. Le réseau mixte technologique ELICITRA a été créé 2010 pour évaluer, comprendre et développer les SDP pour la protection des cultures. Dans le cadre de ce réseau et du projet Casdar PEPS, une trentaine de produits ont été testés pour leur efficacité d'induction de défense, les plus performants ayant ensuite été testés pour leur efficacité de protection du pommier vis-à-vis de la tavelure et du feu bactérien (Gaucher et al., 2020). A partir de ces résultats et d'autres résultats acquis dans l'équipe, quatre SDP (ASM, PhP, Kendal et COS-OGA) ont été sélectionnés pour cette thèse et sont décrits dans le chapitre

II. Ces quatre SDP ont été sélectionnés sur la base de résultats de protection, leur diversité de nature et de mode d'action (éliciteurs généraux vs analogues hormonaux).

b- L'ASM, un SDP prometteur pour la lutte contre *Vi* et *Ea*

L'acibenzolar-S-méthyl (ASM) est un analogue fonctionnel de l'acide salicylique et l'un des SDP les plus prometteurs sur plusieurs espèces végétales (Gozzo and Faoro, 2013). La **Figure 16** illustre l'homologie entre les molécules d'acide salicylique et d'ASM.

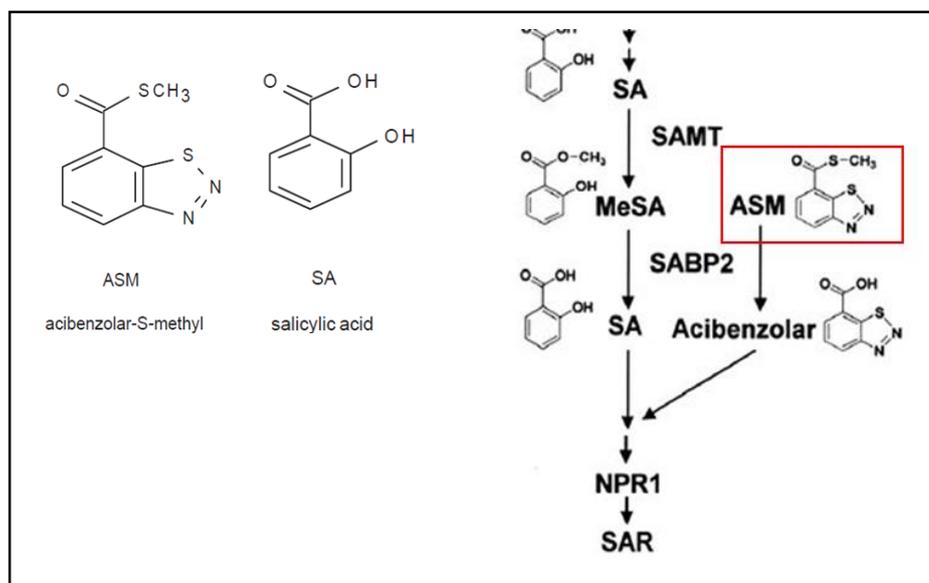


Figure 16 : Formules de l'ASM et l'acide salicylique (à gauche) et voie métabolique activée par l'acibenzolar-s-méthyl (à droite). Adaptée de Tripathi et al., (2010).

L'homologie entre cette molécule et l'acide salicylique permet à l'ASM d'être reconnu par les récepteurs de l'acide salicylique, en particulier SABP2 (**Figure 16**, Tripathi et al., 2010). Ainsi, l'ASM favorise la résistance systémique acquise (SAR) et, par conséquent, l'induction de diverses réponses de défense, y compris des protéines liées à la pathogénèse (protéines PR), ce qui conduit à la protection de nombreuses espèces contre un large spectre d'agents pathogènes (Romero et al., 2001; Assis et al., 2015; Matsuo et al., 2019; Youssef et al., 2019; Ishiga et al., 2020).

Concernant le pommier, plusieurs études ont fait état d'un contrôle significatif de la tavelure (Bengtsson et al., 2006; 2009; Marolleau et al., 2017) et du feu bactérien (Brisset et al., 2000; Maxson-stein et al., 2002; Hassan and Buchenauer, 2007; Abo-elyousr et al., 2010; Shahini Sough et al., 2010; Dugé de Bernonville et al., 2014; Aćimović et al., 2015; Johnson et al., 2016; Marolleau et al., 2017), ainsi que l'induction de défenses au niveau moléculaire (Brisset et al., 2000; Ziadi et al., 2001; Maxson-stein et al., 2002; Dugé de Bernonville et al., 2014; Warneys et al., 2018). En complément de son efficacité et de sa polyvalence, l'avantage de l'ASM est sa toxicité modérée sur l'environnement et les organismes vivants. L'ASM cible la plante plutôt que le bioagresseur directement, donc la toxicité sur les microorganismes non cibles est limitée. De plus la proximité de la molécule active avec une molécule naturelle rend sa dégradation par les organismes vivants dont l'homme plus facile (Robinson, 2007).

c- Comprendre les mécanismes activés par les SDP pour augmenter leur efficacité en vergers

Les SDP n'ont souvent qu'une efficacité de protection partielle et variable. En effet, l'efficacité des SDP est souvent inférieure au champ par rapport à l'efficacité testée en conditions contrôlées (Marolleau et al., 2017) et peut fluctuer d'une année à l'autre (Brisset et al., 2000). La performance des SDP est aussi affectée par des facteurs biotiques et abiotiques et en particulier par les agents pathogènes et les génotypes au champ (Walters et al., 2013).

La performance limitée des SDP en verger réduit le potentiel de cette méthode comme alternative aux pesticides. Comprendre les mécanismes impliqués dans les SDP et leurs interactions avec les facteurs biotiques et abiotiques est donc essentielle. Entre autres, le facteur génétique est encore peu étudié. Une connaissance approfondie des interactions SDP-génotype pourrait réorienter les programmes de sélection variétale vers des génotypes réactifs aux SDP ou aider au choix des variétés de pommier à déployer dans les vergers.

Chez le pommier, les mécanismes moléculaires induits par certains SDP ont été explorés par des approches transcriptionnelles. La qPFD est un outil moléculaire qui a été développé pour tester l'effet des SDP sur l'induction de défenses dans les plantes, en caractérisant l'expression de 28 gènes de défenses après traitement (Brisset and Dugé de Bernonville, 2011). Cette technologie et d'autres études ont montré par exemple l'induction de l'expression de gènes

de défense et en particulier de protéines PR dans les pommiers après un traitement à l'ASM (Brisset et al., 2000; Ziadi et al., 2001; Maxson-stein et al., 2002; Dugé de Bernonville et al., 2014; Aćimović et al., 2015; Marolleau et al., 2017; Warneys et al., 2018). Ces approches permettent de caractériser les défenses induites par les SDP mais pourraient également être utilisées pour caractériser les interactions SDP-génotype. Plusieurs études ont mis en avant les interactions entre l'ASM et les génotypes de plantes (Maisonneuve et al., 2013; Walters et al., 2013; Marolleau et al., 2017) mais peu d'études ont caractérisé les mécanismes impliqués dans ces interactions. Marolleau et al., (2017) suggèrent l'implication de seuil d'expression des défenses dans la variabilité de la résistance des génotypes après un traitement à l'ASM. D'autres approches moléculaires pourraient être intéressantes comme celle utilisée par Sarkate et al., (2018), qui met en évidence des métabolites comme les aucuparines, noraucuparines et eriobofuranes dans la résistance à *Vi* après un traitement avec un éliciteur. Une telle approche métabolomique permettrait peut-être de révéler des voies de défense impliqués dans l'interaction ASM-génotype.

4- Objectifs de la thèse

L'arboriculture est un système agricole qui repose actuellement majoritairement sur l'utilisation intensive de traitements phytopharmaceutiques pour garantir la productivité et le calibrage des productions. La mise en évidence de la dangerosité des traitements répétés sur l'environnement et la santé a contribué à engager une modification des pratiques. Une volonté forte de développement de nouvelles stratégies plus durables a permis d'évoluer vers des systèmes agricoles raisonnés. De nouvelles méthodes ont été développées pour limiter le développement des principales maladies qui impactent les vergers. Une voie de recherche très active depuis plusieurs dizaines d'années est la création de variétés résistantes. L'efficacité de ces résistances a été largement exploitée mais les producteurs se trouvent depuis longtemps confrontés au problème du contournement des résistances génétiques par les populations d'agents pathogènes.

Le nouvel objectif de la recherche est donc de trouver des méthodes de lutte alternatives aux pesticides toujours plus durables. Pour répondre à cet objectif, une des solutions envisagées est de combiner des méthodes de lutte. Combiner des méthodes, qui exercent des pressions de

sélections différentes sur les agents pathogènes, conduirait à un état de compromis adaptatif pour ces populations (REX Consortium, 2016).

Les résistances génétiques sont très efficaces mais peuvent être rapidement contournées. Les résistances quantitatives sont considérées comme plus durables que les résistances qualitatives du fait de leur caractère polygénique (Parlevliet, 2002; Pilet-Nayel et al., 2017) même si l'érosion de QTLs a également été démontrée (Caffier et al., 2014, 2016).

Les résistances induites par les SDP, en activant plusieurs mécanismes, se rapprochent des résistances quantitatives. Ces résistances n'ont pas encore exercé de pressions notoires sur les populations pathogènes mais leur efficacité sur le terrain est très variable. Combiner ces deux méthodes pourrait donc améliorer à la fois l'efficacité de la protection et sa stabilité dans le temps et en fonction des conditions environnementales.

L'efficacité de la combinaison des résistances génétiques et des résistances induites par les SDP ainsi que les mécanismes sous-jacents à cette combinaison ont donc été explorés au cours de ma thèse. Deux maladies ont été ciblées, la tavelure et le feu bactérien, et l'étude a porté sur deux types de population, une descendance issue de croisement contrôlé et une collection de variétés anciennes. Dans les deux cas, une large gamme de variation du niveau de résistance à ces deux maladies était présente.

Pour explorer l'efficacité de combinaison de ces résistances, plusieurs questions ont été soulevées :

- Les résistances génétiques et les résistances induites sont-elles complémentaires ? sont-elles interactives ?
- Les résistances génétiques peuvent-elles être modulées par un SDP ou, inversement, les résistances induites par un SDP varient-elles selon le fond génétique ?
- L'efficacité des résistances induites par les SDP est-elle corrélée au niveau constitutif des défenses ?
- Quels sont les mécanismes de défenses activés par ces deux types de résistances séparément et surtout conjointement ?
- Existe-t-il des marqueurs moléculaires (polymorphisme ADN, expression de gènes, métabolites) prédictifs des résistances génétiques et induites par les SDP ?

Pour répondre à ces questions, trois axes d'études ont été définis qui structurent ma thèse.

Dans le premier axe (chapitre III), nous nous sommes intéressés au gain de protection apporté par le cumul des deux types de résistances. Des tests de protection ont été conduits sur les deux populations pour évaluer l'effet des résistances génétiques et induites par les SDP, seuls et en combinaison. Ces tests ont été réalisés pour évaluer et comparer la complémentarité et/ou l'interactivité des deux méthodes de lutte à l'échelle macroscopique vis-à-vis de la tavelure et du feu bactérien.

Dans le second axe (chapitre IV), une approche de cartographie génétique de QTLs avec et sans pré-traitement SDP a été conduite sur la descendance afin d'étudier les potentiels déterminants génétiques impliqués dans la réactivité au SDP et l'influence du traitement sur les QTLs de résistance.

Dans le troisième axe (chapitre V), nous nous sommes intéressés aux mécanismes activés par les résistances génétiques, induites par les SDP ou le cumul des deux résistances. Par des approches transcriptionnelles ciblées et de métabolomique non ciblée, ces mécanismes de défenses ont été étudiés sur la collection et sur un sous ensemble de la descendance, représentant différentes classes de combinaison de QTLs de résistance à la tavelure. L'objectif de cette approche a été d'identifier des gènes ou signaux métaboliques différenciellement activés en fonction des groupes de résistances génétiques et du traitement réalisé (eau ou SDP) et d'évaluer le niveau de corrélation entre la modulation de ces marqueurs moléculaires et la résistance et l'efficacité du SDP, pour en dériver éventuellement des marqueurs prédictifs.

Chapitre II :

Matériel et méthodes

1- Matériel végétal

Pour explorer la variabilité des résistances génétiques et des résistances induites par un SDP, deux populations complémentaires ont été étudiées : une descendance, représentant un pool de diversité étroit mais facilement caractérisable par des marqueurs moléculaires en ségrégation, et une collection de ressource génétique, représentant un pool de diversité plus large, représentatif de la variabilité totale des variétés de pommier. Les variétés Golden Delicious et Gala ont été utilisées dans les tests phénotypiques comme témoins de sensibilité à la tavelure et au feu bactérien.

a- Descendance

La descendance étudiée, nommée « descendance TxF » ou « Famille F » est issue du croisement entre deux génotypes, TN10-8 et Fiesta. Ce croisement a été réalisé dans le cadre du projet européen DARE (Durable Apple Resistance in Europe, 1998-2002), à la Station d'Amélioration des Espèces Fruitières et Ornementales de l'INRAE d'Angers en 1996 (Lespinasse et al., 2000). Chacun des deux parents est porteur d'allèles de résistance à la tavelure et/ou au feu bactérien.

TN10-8 est un hybride issu du croisement entre la variété Reinette Clochard et un descendant de la variété russe Schmidt's Antonovka P.I.172632 connue pour sa bonne résistance à la tavelure (Calenge et al., 2004; Bus et al., 2012). Ce génotype est porteur de l'allèle de résistance à la tavelure du QTL qT1, détecté par Calenge et al., (2004). Fiesta est une variété commercialisée, issue du croisement entre la variété anglais Cox's Orange Pippin connue pour sa faible sensibilité à la tavelure et la variété sensible Idared. La variété Fiesta porte les allèles de résistance des QTLs qF11 et qF17 pour la tavelure, détectés par Durel et al., (2003), Liebhard et al., (2003) et Calenge et al., (2004) et du QTL qF7 pour le feu bactérien détecté par Calenge et al., (2005) et Khan et al., (2007).

La descendance TxF est composée de 269 génotypes dans lesquelles ségrègent les allèles de résistance au niveau de ces différents QTLs, et potentiellement au niveau d'autres QTLs non encore détectés tant vis-à-vis de la tavelure que du feu bactérien.

Seize génotypes ont été sélectionnés comme représentants de quatre classes génotypiques contrastées de QTLs de résistance à la tavelure, définis par Laloï al, 2016 : « Sans QTL », « QTL qT1 », « QTLs F11+F17 » et « QTLs T1+F11+F17 ». Plus précisément, les 4 classes correspondent à la présence/absence des allèles de résistance à ces différents QTLs dans le contexte d'hétérozygotie propre au pommier : pour simplifier le langage dans la suite du document, 'l'absence d'un QTL' correspondra à l'absence de l'allèle de résistance à ce QTL pour une classe donnée, et la 'présence d'un QTL' correspondra à la présence de l'allèle de résistance à ce QTL (en situation hétérozygote 'résistance/sensibilité') pour une classe donnée.

Ces descendants ont été choisis d'après les données de génotypage de marqueurs SSR encadrant les intervalles de confiance des QTLs (Laloï, 2016). La liste des représentants de chaque classe a cependant évolué entre chaque test en fonction de la disponibilité du matériel végétal, de l'acquisition de nouvelles données de génotypage SNP (chapitre III) et de phénotypage pour s'affranchir de l'effet d'éventuels QTLs non encore tracés au moment des tests précédents. La liste des génotypes utilisés comme représentants des quatre classes de QTLs pour chacun des tests pathologiques est détaillée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Liste des 16 génotypes sélectionnés dans la thèse de G. Laloi (Laloi, 2016) et dans les tests phénotypiques de résistance à la tavelure réalisés dans cette thèse (Vi-B04_EAPK, Vi-B04_EAPC et Vi-B04_EA) comme représentants des quatre classes de QTLs de résistance à la tavelure (sansQTL, T1, F11F17 et T1F11F17).

Génotype	Classe	Tests pathologiques			
		Thèse G. Laloi	Vi-B04_EAPK	Vi-B04_EAPC	Vi-B04_EB
F025	SansQTL	x	x	x	x
F038	SansQTL	x			
F138	SansQTL			x	x
F183	SansQTL	x	x		
F193	SansQTL		x	x	x
F233	SansQTL			x	x
F275	SansQTL	x			
F064	T1			x	x
F117	T1	x	x	x	x
F187	T1	x	x		
F207	T1			x	x
F214	T1	x	x		
F244	T1			x	x
F323	T1	x	x		
F047	F11F17	x	x		
F135	F11F17			x	x
F139	F11F17	x		x	x
F171	F11F17	x	x	x	x
F336	F11F17	x	x	x	x
F072	T1F11F17			x	x
F073	T1F11F17	x	x	x	x
F079	T1F11F17	x	x		
F081	T1F11F17	x	x	x	x
F112	T1F11F17	x	x		
F259	T1F11F17			x	x

b- Collection de ressources génétiques

La collection de ressources génétiques étudiée, appelée Cc pour « core collection étendue », est composée d'environ 400 variétés anciennes de pommier. Cette collection est issue du regroupement entre la core collection INRAE, constituée par Lassois et al., (2016) et composée de ~270 variétés représentant 90% de la diversité des variétés anciennes de pomme à couteau (majoritairement française) et d'un pool de ~130 variétés supplémentaires représentant plus particulièrement la diversité des variétés anglaises (origine des QTLs qF11 et qF17).

Avant le démarrage de ma thèse, l'ensemble des 400 variétés de la Cc avait été génotypé à l'aide d'une puce génotypage Axiom 480k-SNP, développée avec la Fondation Edmund Mach (FEM ; Bianco et al., 2016) dans le cadre du projet européen FruitBreedomics (2011-2016). Plusieurs séries de données de phénotypage pour la résistance à la tavelure et au feu bactérien étaient également disponibles sur cette collection. Ces données sont détaillées dans la partie 2e de ce chapitre (**Tableau 3**).

Parmi la Cc, 32 variétés ont été sélectionnées au début de ma thèse pour une étude plus approfondie des mécanismes de défense (Cc_32). Ces 32 variétés ont été choisies pour leur diversité de résistance/sensibilité à la tavelure et au feu bactérien à partir des données de phénotypage acquises préalablement. La liste des 32 variétés est présentée dans le **Tableau 2** ainsi que les informations relatives à leur niveau de sensibilité à la tavelure et au feu bactérien. Les MUNQ, présentés dans le **Tableau 2**, correspondent à des numéros uniques de génotypes décrits dans le chapitre I.

Tableau 2 : Liste des 32 variétés anciennes de pommier constituant la CCe_32 et synthèse de leur niveau de sensibilité à la tavelure et au feu bactérien. Les variétés sont caractérisées par un nom d'usage (Nom), un numéro d'accession (Accession) et un numéro unique de génotype (MUNQ, Denancé et al., 2020).

Nom	Accession	MUNQ	Sensibilité tavelure	Sensibilité feu bactérien
Gewurtzluiken	X09437	315	Très résistant	Intermédiaire
Maiapfel	X09433	481	Très résistant	Résistant
Minnesota Crunch	X08149	1489	Très résistant	Intermédiaire
Reinette Marbrée de Luzoir	X08609	4859	Très résistant	-
Discovery	X02621	75	Résistant	Sensible
Pomme Orange	X00942	179	Résistant	Sensible
Margil	X08398	732	Résistant	-
Pomme Blanche d'Été	X00352	1554	Résistant	Intermédiaire
Rose de Berne	X07199	83	Résistant	Très résistant
Reinette de Champagne	X07198	91	Intermédiaire	-
Châtaignier	X01212	205	Intermédiaire	Intermédiaire
Calville d'Août	X01363	636	Intermédiaire	Sensible
Alfred Jolibois	X00395	520	Intermédiaire	Très résistant
Gueule de Mouton	X08246	59	Intermédiaire	Très résistant
George Carpenter	X08719	523	Intermédiaire	Très sensible
Saint Michel	X08236	458	Intermédiaire	Très résistant
Reinette Bergamotte	X02302	28	Intermédiaire	Sensible
Reinette Thouin	X08412	134	Intermédiaire	Intermédiaire
Pomme Cloche	X07195	85	Intermédiaire	Intermédiaire
Reinette de Geer	X08734	89	Intermédiaire	Sensible
Carmignole Musquée	X08384	102	Sensible	Sensible
Eri Sagarra	X00700	170	Sensible	Très sensible
Reinette de Multhaupt	X01180	70	Sensible	Sensible
Barbe	X06194	1021	Sensible	Très résistant
Vedette du Béarn	X08226	466	Sensible	Sensible
Fiesta	X04681	763	Sensible	Résistant
Roxbury Russet	X01349	8	Sensible	Très sensible
Gascogne Scarlet	X01560	45	Sensible	Sensible
Reinette Simirenko	X08742	784	Sensible	Sensible
Rose Douce	X02953	420	Sensible	Sensible
Transparente Blanche	X07200	25	Sensible	Sensible
Romarin Blanc	X01894	55	Très sensible	Sensible

2- Mise en place de tests pathologiques et évaluation

a- Comparaison du traitement SDP avec la condition de témoin 'Eau'

Les copies (répétitions biologiques) de chaque génotype sont réparties en blocs et randomisées selon le nombre de modalités de traitement. Pour chaque test, une modalité de traitement à l'eau est réalisée en parallèle des traitements SDP comme condition témoin. La plupart des tests sont réalisés selon deux modalités de traitement, Eau et ASM. Pour les représentants des classes de QTLs de résistance à la tavelure, 4 modalités sont étudiées : Eau, ASM, PhP et Kendal (ou COS-OGA dans un second temps). La justification du choix de ces 4 SDP est explicitée dans le chapitre I.

Deux jours avant l'infection, les plants sont pulvérisés avec une solution correspondant au traitement SDP (**Figure 17**) selon les concentrations suivantes :

ASM : Le produit utilisé pour le traitement à l'ASM est le BION[®] 50 WG (50% ASM ; Syngenta, Basel, Switzerland). La concentration recommandée pour l'application du BION[®] est 0,4 g.L⁻¹. Cependant, pour conserver une variabilité phénotypique suffisante, plusieurs concentrations ont été testées. Les deux concentrations maintenues sont 0,2 g.L⁻¹ et 0,4 g.L⁻¹. La concentration utilisée sera précisée pour chacune des expérimentations.

PhP : Le produit utilisé pour le traitement au LBG est le LBG-01F34[®] (730 g.L⁻¹ de phosphonate de potassium, De Sangoss), à la concentration de 10 mL.L⁻¹, correspondant à la dose recommandée.

Kendal : Le KENDAL[®] est commercialisé à l'origine en tant que fertilisant par Valagro[®]. Le complexe GEA 249 présent dans le produit agit sur la vigueur des plantes. Il a donc été testé et validé également pour son effet sur la stimulation des défenses. Le traitement est appliqué à une concentration de 7,5 mL.L⁻¹, correspondant à la dose recommandée. La molécule active n'étant pas connue le nom commercial du produit, soit Kendal, sera utilisé dans la suite du document.

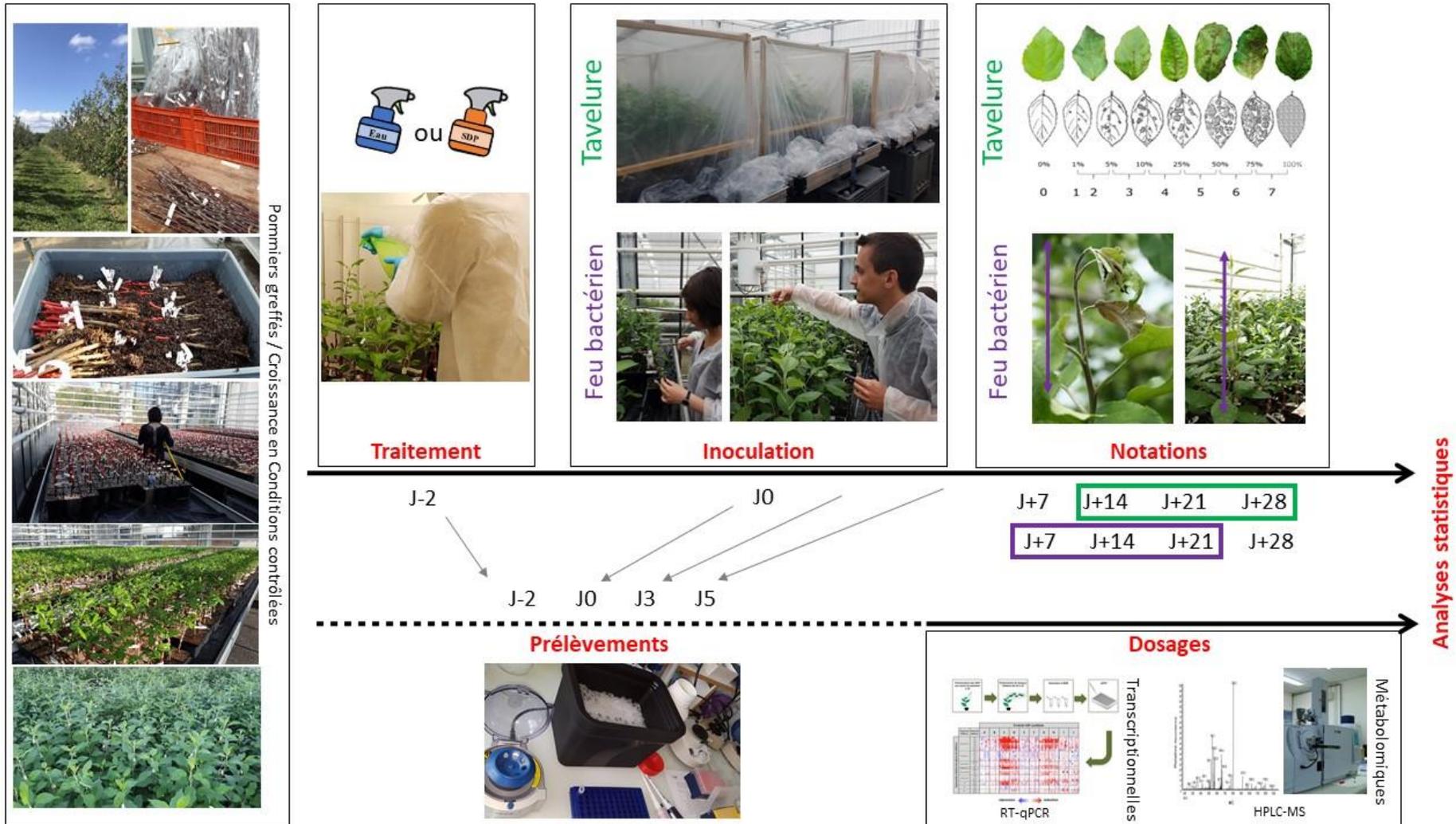


Figure 17 : Frise chronologique illustrant les principales étapes des tests réalisés pendant cette thèse : l'obtention des plants greffés de pommier, les tests pathologiques (traitements SDP, inoculations, cinétiques de notation) et les prélèvements d'échantillons pour les dosages transcriptionnels et métabolomiques.

COS-OGA : Le produit utilisé pour le traitement au COS-OGA est le Messenger[®] ou le Blason[®] commercialisé par Syngenta à la concentration de 1,5 g.L⁻¹, correspondant à la dose recommandée.

Pour limiter l'éventuelle photo-dégradation des substances actives contenues dans les SDP, l'étape de traitement est réalisée à l'obscurité (stores fermées, lumière éteinte).

b- Inoculation

Pour les tests de résistance à la tavelure, deux souches de *Vi* ont été utilisées : la souche de référence EU-B04 et la souche 09BCZ14. La souche EU-B04 a été isolée en Belgique sur la variété Golden Delicious. Cette souche, décrite par Caffier et al., (2015) et Le Cam et al., (2019), a été sélectionnée pour son agressivité intermédiaire par rapport aux autres souches de références. La souche 09BCZ014 a été isolée en France sur le descendant E063 du croisement TN10-8 x Prima. Cette souche est aussi référencée sous le numéro 2557 dans Laloi et al., (2017). La souche 09BCZ014 a été sélectionnée pour sa capacité de contournement du QTL majeur présent sur le groupe de liaison 1 de TN10-8 (Laloi et al., 2017). L'inoculum est préparé par resuspension de spores provenant de feuilles séchées et sporulantes (recouvertes de spores de *Vi*, conservées au congélateur à -20°C) dans de l'eau osmosée. Cette suspension de spores est ajustée à la concentration 2,5 x 10⁵ conidies par mL et pulvérisée sur les jeunes feuilles à l'aide d'un pulvérisateur manuel. Les plants sont ensuite incubés pendant 48h à 17°C et sous bâche pour maintenir le plus haut niveau d'humidité, nécessaire à la germination des spores selon les recommandations décrites dans Caffier et al., (2010). Les plants sont ensuite débâchés et maintenus à 19°C et 80% d'humidité.

Pour les tests de résistance au feu bactérien, la souche de référence d'*Ea* CFBP1430 a été utilisée. Cette souche est issue de la collection française de bactéries phytopathogènes (Paulin and Samson, 1973). La préparation de l'inoculum est décrite dans (Dugé de Bernonville et al., 2014). L'inoculation a été réalisée par blessure, en coupant les deux plus jeunes feuilles déroulées avec des ciseaux trempés dans une suspension bactérienne à la concentration de 10⁸ colony-forming units (CFU) par mL. Les plants sont maintenus durant l'inoculation et les notations à 22°C et 60% d'humidité.

c- Notations

Pour chaque expérimentation la sévérité des symptômes est notée une fois par semaine pendant 3 semaines (**Figure 17**). Les symptômes sont notés 14, 21 et 28 jours après l'inoculation pour la tavelure et 7, 14 et 21 jours après l'inoculation pour le feu bactérien.

La sensibilité à *Vi* est évaluée par le pourcentage de surface foliaire couverte par les lésions de sporulation. La surface de sporulation est estimée selon une échelle de note s'étalant de 0 à 7, décrite par Calenge et al., (2004). La sensibilité à *Ea* est évaluée par le ratio entre la longueur de la nécrose présente sur la tige et la longueur totale de la pousse. Cette méthode d'évaluation a été précédemment décrite par (Calenge et al., 2005; Khan et al., 2006).

Les trois notes successives obtenues pour chaque plante ont été intégrées dans une AUDPC (aire sous la courbe de progression de la maladie), traduisant la sensibilité globale et l'évolution de cette sensibilité sur la cinétique du test. Les méthodes d'analyse statistique utilisées pour chaque test sont décrites dans les parties correspondantes.

d- Synthèse des données de phénotypage disponibles

Sur l'ensemble des quatre populations décrites précédemment (descendance complète, 16 descendants des 4 classes génotypiques, CCe, CCe_32), les données de 23 tests phénotypiques sont disponibles. L'ensemble de ces données est détaillé dans le **Tableau 3**. Treize des tests ont été réalisés et analysés pendant la thèse et les 10 autres sont issus de données de phénotypage précédemment acquises et analysées dans l'équipe.

Un premier test a été réalisé en 2017 sur un ensemble d'individus de la descendance et des variétés de la CCe pour choisir la souche de *Vi* et la concentration de l'inoculum. Les résultats de ce test ont permis de sélectionner la souche (EU-B04) et la concentration ($2,5 \times 10^5$ conidies par mL), qui permettent de mettre en avant le plus de diversité de niveaux de résistance entre les génotypes. Les résultats de ce test ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. La concentration du traitement à l'ASM a été ajustée en fonction des résultats de différents tests préliminaires, de manière à conserver à nouveau le plus de diversité dans les niveaux de résistance des génotypes traités.

Tableau 3 : Résumé des données de phénotypage acquises pendant la thèse (en fin 2017 en vert, 2018 en bleu, 2019 en orange et 2020 en violet) et disponibles préalablement à ma thèse (en gris).

Population	Tavelure					Feu bactérien
	<i>EU-B04</i>	<i>09BCZ14</i>	<i>NL24</i>	<i>D42</i>	<i>Mélange de souches</i>	
Descendants + CCe_32	Test pour choix souche et concentration de l'inoculum					
Descendance	Vi-B04_1 Vi-B04_2 + 1 test*	Vi-Z14	-	-	-	Ea-1430_1 Ea-1430_2
Représentants classe QTLs	Vi-B04_EAPK Vi-B04_EAPC Vi-B04_EA + 1 test*	-	-	-	-	-
CCe	Vi-B04_CCe_2012 Vi-B04_CCe_2016	-	Vi-NL24_CCe_2013 Vi-NL24_CCe_2018	Vi-D42_CCe_2017	Vi-mix_CCe_2013 Vi-mix_CCe_2017	Ea-1430_CCe_2012 Ea-1430_CCe_2013 Ea-1430_CCe_2018
CCe_32	Vi-B04 ₃₂ _1 ^a Vi-B04 ₃₂ _2 + 2 tests*	-	-	-	-	Ea-1430 ₃₂ _1 ^b Ea-1430 ₃₂ _2

* tests réalisées mais dont les données ne sont pas exploitables. La tavelure ne s'est pas correctement développée car les conditions de culture ou d'autres stress biotiques (attaque de thrips) ont vraisemblablement modifié/perturbé la physiologie des plantes ce qui a probablement stimulé leur potentiel de défenses avant l'inoculation.

^{a,b} La concentration du pré-traitement à l'ASM est 0,2 g.L⁻¹ pour les tests de sensibilité à la tavelure, sauf pour Vi-B04₃₂_1^a (0,4 g.L⁻¹), et 0,4 g.L⁻¹ pour les tests de sensibilité au feu bactérien, sauf pour Ea-1430₃₂_1^b (0,2 g.L⁻¹).

Chaque test réalisé sur la descendance et la CCe_32 a été répété deux fois pour valider les observations, à l'exception de l'inoculation avec la souche 09BCZ14 faite une seule fois pour la descendance. Concernant la population de représentants des classes de QTL, trois séries de tests ont été réalisés avec les traitements Eau (E), ASM (A), PhP (P), Kendal (K) et/ou COS-OGA (C). En 2018, les traitements Eau, ASM, PhP et Kendal ont été testés par rapport à la souche EU-B04, le test est donc désigné Vi-B04_EAPK. Du fait de l'absence d'effet de protection du Kendal, ce produit a été remplacé par le COS-OGA en 2019, lors du test Vi-B04_EAPC. En 2020, seuls les traitements Eau et ASM ont été conservés pour le test Vi-B04_EA.

3- Analyses transcriptionnelles et métabolomiques

Afin d'analyser les mécanismes de défense mis en place lors de la résistance à la tavelure ou au feu bactérien, deux approches moléculaires complémentaires ont été mises en place : une analyse ciblée de l'expression de gènes de défense et une étude globale des métabolites différenciellement accumulés après inoculation et/ou induction par un SDP.

a- Prélèvement des échantillons et protocole d'extraction

Pour chaque prélèvement, deux jeunes feuilles par plante ont été recueillies. Pour étudier les défenses constitutives et induites par un SDP (avant l'inoculation), des échantillons ont été prélevés le jour de l'inoculation (soit deux jours après le traitement SDP ou eau sur les représentants des classes de QTL, la CCe et la CCe_32. Pour la CCe, seules les défenses constitutives ont été étudiées. Pour étudier les défenses induites par l'inoculation, des échantillons ont également été prélevés après inoculation sur les représentants QTLs, à différents temps décrits dans la **Figure 17**. Les échantillons de feuille collectés ont été congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

L'ARN des échantillons destinés aux analyses transcriptomiques a été extrait selon la procédure du kit d'extraction NucleoSpin® RNA Plant. Les échantillons d'ARN ont été dosés et dilués à 0,5 g.µL⁻¹ avant l'étape de reverse transcription. La qualité et la pureté des échantillons d'ADNc ont été vérifiées par PCR.

Les échantillons utilisés pour les dosages métaboliques ont été lyophilisés. Le broyage des échantillons (broyeur à bille), et l'extraction des métabolites ont été réalisés sur la plateforme PASM (Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique : <https://ensaia.univ-lorraine.fr/fr/content/plateau-danalyse-structurale-et-metabolomique>) à Nancy. L'extraction a été réalisée sur 8mg de matière sèche par macération dans un mélange eau/méthanol (30/70). Cette méthode d'extraction permet de récupérer une large gamme de molécules de natures et de propriétés physico-chimiques variées comme les sucres, les acides aminés, les acides gras ou les terpènes mais exclut les molécules de masse très élevées (>1000 Da), à forte polarité ou hydrophobes comme les composés volatiles et les sesquiterpènes (Villas-Bôas et al., 2005).

b- Analyses transcriptionnelles

Les analyses transcriptionnelles ciblées ont été réalisées par RT-qPCR sur les échantillons issus des représentants QTLs, de la CCe et de la CCe_32. Pour identifier des gènes de défense impliqués dans les résistances génétiques et induites par les SDP, une gamme de gènes de défense a été analysée.

Le choix des gènes de défense à analyser constitue une première étape essentielle dans l'analyse transcriptionnelle. Sur la base des connaissances et des résultats précédemment acquis dans l'équipe Respom (Gaucher, 2012; Dugé de Bernonville et al., 2014; Laloi, 2016), 35 familles de gènes ont été sélectionnées. Ces familles ont été sélectionnées selon plusieurs critères : le rôle dans les défenses, le niveau d'expression modulé par l'inoculation de *Vi* ou *Ea* et/ou le niveau d'expression modulé par le traitement à l'ASM.

Une caractérisation bio-informatique de ces familles a été réalisée par S. Aubourg (équipe Bidefi, IRHS) à l'aide de l'annotation structurale du génome du pommier haploïde-doublé GDDH13 (Daccord et al., 2017). Cette caractérisation a permis d'identifier toutes les séquences homologues appartenant à une même famille de gènes. Au total 1147 séquences ont été réparties sur les 35 familles de gènes et les 3 familles de gènes de ménage (Actin, Tubulin alpha (TuA) et Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)).

Certaines familles sont de petite taille (quelques séquences), d'autres contiennent plus de 70 séquences. Dans le but d'identifier la/les séquence(s) fonctionnelle(s), une étude d'homologie des séquences protéiques a été réalisée avec les séquences de la même famille de gènes présentes dans d'autres espèces végétales et identifiées dans la littérature comme étant impliquées dans - ou associées - à la résistance. Pour cela, une étude phylogénique de la famille de gènes, incluant les séquences homologues chez le pommier et chez la/les autres espèces végétales identifiées dans la littérature, a été réalisée sur le site web de Phylogénie (Dereeper et al., 2008) en utilisant l'algorithme MUSCLE pour l'alignement multiple. La séquence de pommier la plus proche de celle fonctionnelle d'une autre espèce a été sélectionnée pour le dessin d'amorces RT-qPCR.

Pour évaluer correctement et comparer l'expression de gènes de défense sur la Cc, il est important de dessiner des amorces efficaces et spécifiques sur l'ensemble des variétés. Or, la large variabilité génétique explorée au sein de la Cc et le fort polymorphisme nucléotidique existant chez le pommier (4.4 SNPs par kb, Velasco et al., (2010)) peuvent entraîner la présence de SNP au niveau des régions génomiques ciblées par les amorces qPCR chez certains génotypes, conduisant à un biais technique dans les analyses d'expression. Un tel polymorphisme SNP pourrait ensuite générer une différence de mesure de l'expression du gène ciblé entre variétés qui tiendrait davantage à la différence de séquence des régions ciblées par les amorces qu'à une réelle différence d'expression du gène entre variétés présentant ce polymorphisme. Nous avons donc cherché à valoriser les informations de séquence existantes pour le pommier dans la bibliographie. Bien qu'il n'existe pas de données de séquençage pour l'ensemble des variétés de la Cc, une étude des zones non polymorphes à l'intérieur des séquences des familles de gènes a été réalisée sur la base des données de séquençage disponibles : le Dr Diego Micheletti de la Fondazione Edmund Mach (Italie) a cartographié les « reads » (« mapping de reads ») de reséquençage de 91 variétés de pommier, obtenus par (Bianco et al., 2016; Duan et al., 2017), sur le génome GDDH13. Ensuite, une analyse bioinformatique des résultats de ce « mapping » a permis d'effectuer le « calling de SNP » sur l'ensemble du génome au sein des 91 variétés. Enfin de mettre en évidence les régions codantes les mieux conservées dans la sélection de gènes, des zones dites ZNP (pour Zones Non Polymorphes) ont été définies par S. Aubourg pour les familles de gènes de défense caractérisées ci-dessus. Ces ZNP dans des exons dépourvus de SNPs sur au moins 50 pb. Des

ZNP ont pu être identifiées dans 98% des gènes ciblés. Des amorces ont ensuite pu être dessinées dans les ZNP de chaque séquence cible. En considérant que la variabilité des séquences au sein des 91 variétés reséquencées représente correctement celle contenue dans la Cc, les amorces obtenues ont été considérées comme ciblant des régions génomiques non polymorphes sur l'ensemble de la Cc.

Les amorces ont été dessinées dans l'outil PrimerQuest® ($62 < T_m (^{\circ}C) < 64$; $100 < \text{taille de l'amplicon (bp)} < 150$), à partir d'une ZNP continue de 100 bp ou de deux régions de 50 bp, séparées par une zone polymorphe de 50 à 150 bp. La spécificité des amorces, par rapport aux autres séquences de la famille de gènes, a été vérifiée par MultAlin (Corpet, 1988) et par rapport à l'ensemble du génome en utilisant le navigateur de génome GDDH13 installé sur le serveur d'unité. Chaque paire d'amorces a également été évaluée par qPCR pour leur spécificité et leur efficacité en utilisant un pool d'ADNc représentant la diversité des génotypes étudiés.

A partir des données d'expression acquises par RT-qPCR, des analyses statistiques (analyses de variance, corrélations) ont été réalisées. Les données d'expression de la Cc ont également été étudiées en génétique d'association (GWAS) pour identifier des QTLs d'expression (eQTLs).

c- Dosages métabolomiques

Les profils métaboliques de chaque extrait ont été obtenus par une analyse de chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse Orbitrap (HPLC-MS/MS) en mode d'ionisation positive sur la plateforme PASM. Le pré-traitement des données (détection des pics, alignement) a été réalisé en utilisant l'outil en ligne XCMSonline (<https://xcmsonline.scripps.edu>) en utilisant les paramètres « UPLC-Orbitrap II » pour lequel la sensibilité de détection des pics a été optimisée (Maximum peak width : 50 ; Signal/Noise ratio : 20 ; prefilter peaks : 3 ; prefilter intensity : 5000 ; Noise Filter : 50000). XCMSonline fournit une liste de signaux métaboliques, correspondants à une masse associée à un temps de rétention ainsi que la valeur des aires sous le pic, mesurées pour chaque signal et dans tous les échantillons. Les données générées sont traitées sur la plateforme d'analyse chimométrique MetaboAnalyst (Xia et al., 2009). Avant l'analyse chimométrique, les

données sont d'abord filtrées afin d'éliminer les signaux avec une faible répétabilité (déterminés par le relative standard deviation/mean), puis elles sont ensuite normalisées par la méthode Pareto. Les pré-analyses et l'extraction des données décrites dans ce paragraphe ont été réalisées par R. Larbat, au LAE de Nancy.

Trois séries d'échantillons, correspondant à un test de mise au point (2018) puis deux répétitions expérimentales (2019 et 2020), ont été envoyées.

Chapitre III :

Efficacité de protection des résistances
génétiques et des résistances induites
par les SDP

Les résultats acquis dans l'équipe depuis 20 ans ont mis en évidence l'efficacité de protection des résistances génétiques et des SDP indépendamment. Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés à l'efficacité de protection du cumul des résistances génétiques et induites par les SDP. Ce chapitre est structuré en trois parties. La première partie de ce chapitre décrit la variabilité de la sensibilité des génotypes de la descendance et des variétés de la collection à *Venturia inaequalis* (*Vi*) et *Erwinia amylovora* (*Ea*) en présence de SDP. Ensuite, les efficacités de protection des résistances génétiques et induites par les SDP sont comparées dans une deuxième partie et finalement l'interactivité entre ces résistances est évaluée dans la troisième partie du chapitre.

1- Variabilité de la sensibilité de génotypes de pommier à *Venturia inaequalis* et *Erwinia amylovora* en fonction du traitement SDP

La sensibilité à *Vi* et *Ea* est évaluée par l'AUDPC, qui traduit de manière intégrée l'évolution des symptômes de chacune des maladies étudiées sur trois dates de notation. Des tests pathologiques ont été réalisés sur chaque population, comme décrit dans le chapitre II, afin d'évaluer la variabilité de la sensibilité en fonction des résistances génétiques portées par les génotypes et/ou après un traitement SDP. Des répétitions expérimentales de chaque test ont été réalisées pour vérifier la stabilité des résultats obtenus mais les résultats d'un seul test par agent pathogène sont détaillés dans chaque partie.

a- La variabilité de la sensibilité dans la descendance dépend de la composition des génotypes en QTLs de résistance

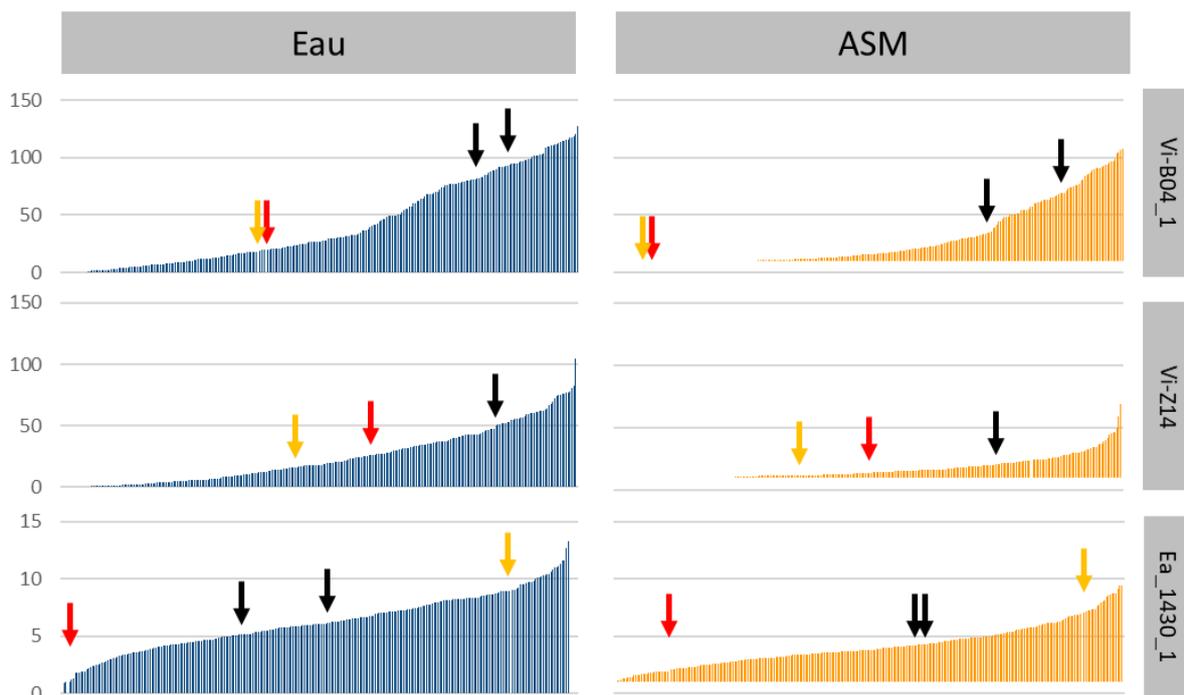


Figure 18 : Gammes de sensibilité des génotypes de la descendance vis-à-vis de deux souches de *Vi*, EUB04 (Vi-B04_1) et 09BCZ14 (Vi-Z14) et de *Ea* (Ea-1430_1), en condition témoin (en bleu) ou après un traitement à l'ASM (en orange). TN10-8 est représenté par une flèche orange, Fiesta par une flèche rouge et les témoins sensibles par une flèche noire. Résultats d'une expérimentation par agent pathogène et par souche.

L'ensemble de la descendance a été testée pour sa sensibilité à la tavelure (souches EU-B04 et 09BCZ14) et au feu bactérien (souche CFBP1430) après traitement à l'eau ou à l'ASM.

Le niveau de sensibilité des génotypes de la descendance varie de 0 à 130 pour la sensibilité à *Vi* et de 0 à 13 pour la sensibilité à *Ea* dans la condition témoin (**Figure 18**). Du fait de la ségrégation des allèles de résistance des différents QTLs qui composent la descendance, celle-ci couvre toute la gamme de sensibilité vis-à-vis des deux agents pathogènes étudiés.

Cependant, la proportion de génotypes très résistants à *Vi* (AUDPC ~0) est supérieure à celle des génotypes très résistants à *Ea*. Nous verrons plus loin que trois QTLs principaux ont été détectés dans cette descendance pour la résistance à la tavelure alors qu'un seul QTL majeur n'a été détecté pour la résistance au feu bactérien (chapitre IV). L'ensemble des QTLs de résistance à la tavelure apportent des niveaux de résistance intermédiaires à forts qui expliquent le décalage dans les proportions de génotype très résistants à *Vi* et *Ea*. Par ailleurs, globalement les génotypes sont plus résistants vis-à-vis de la souche 09BCZ14 que la souche EU-B04.

Quels que soient la souche et l'agent pathogène, le niveau de sensibilité des génotypes de la descendance prétraitée à l'ASM est plus faible. L'AUDPC varie de 0 à 100 pour la sensibilité à *Vi* et de 0 à 11 pour la sensibilité à *Ea*. Malgré une proportion plus importante de génotypes très résistants, la tendance des distributions semble conservée. Les analyses de variance (modèle $AUDPC \sim \mu + \text{Traitement} + \text{Génotype} + \text{Traitement} \times \text{Génotype} + e$) montre que la sensibilité des plants greffés dépend de l'effet significatif des génotypes, du traitement et d'une interaction entre le traitement et les génotypes (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Analyses de variance de l’AUDPC en fonction des facteurs Génotype et Traitement et de l’interaction Génotype x Traitement dans les tests phénotypiques Vi-B04_1, Vi-Z14 et Ea-1430_1.

Test	Facteurs	ddl	F	Pvalue	
Vi-B04_1	Génotype	265	615.1	<2e-16	***
	Traitement	1	17.3	<2e-16	***
	Génotype x Traitement	265	1.8	2.15E-12	***
Vi-Z14	Génotype	265	825.8	<2e-16	***
	Traitement	1	6.5	<2e-16	***
	Génotype x Traitement	265	3.0	<2e-16	***
Ea-1430_1	Génotype	264	908.8	<2e-16	***
	Traitement	1	4.2	<2e-16	***
	Génotype x Traitement	256	1.4	2.13E-04	***

ddl : degrés de liberté, F : valeur F de Fisher, Pvalue : probabilité du test

Ces observations sont retrouvées dans la répétition du test pathologique vis-à-vis de la souche EU-B04 (pas de répétition pour la souche 09BCZ14) avec une corrélation entre les deux tests égale à $R=0,85$ pour la condition témoin et à $0,75$ après le traitement à l’ASM (Annexe - **Figure S1**). Par contre, la corrélation entre les répétitions des tests de sensibilité au feu bactérien est inférieure à $0,4$ (Annexe - **Figure S2**). La 2^{ème} répétition du test de sensibilité Ea-1430_2 a été réalisée au mois de janvier dans des conditions non optimales au développement du feu bactérien. Les jours courts, une défaillance du système d’éclairage et les températures extérieures très basses qui ont été relevées ont pu influencer les conditions à l’intérieur des modules en serre et donc affecter le développement des plants greffés et/ou la croissance d’*Ea*. En raison des conditions climatiques inadaptées, du nombre de copies par génotype plus faible que pour la première répétition, et des résultats de cartographie de QTLs inattendus, les résultats du test Ea-1430_2 ont été écartés. Néanmoins, ces résultats posent la question récurrente de l’influence forte des conditions expérimentales, particulièrement sur la qualité des évaluations de sensibilité au feu bactérien.

b- La sensibilité à Vi varie en fonction des classes de QTLs et/ou des traitements SDP

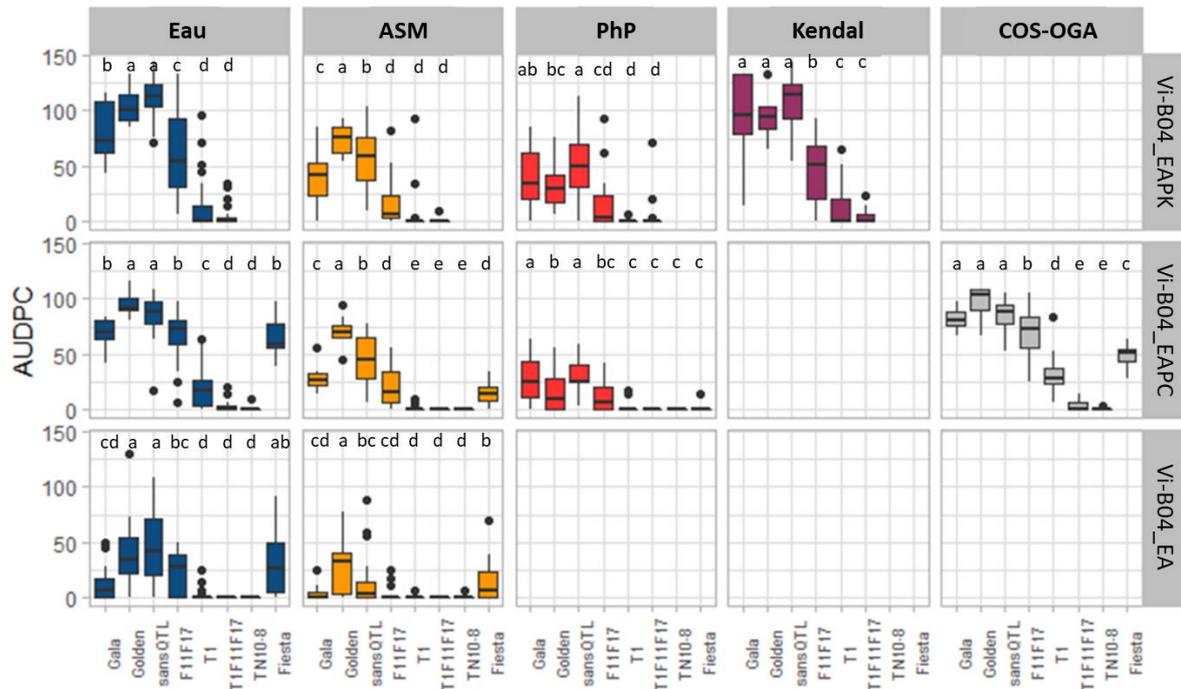


Figure 19 : Gammes de sensibilité des témoins, des représentants des classes de QTLs et des parents (TN10-8 et Fiesta) vis-à-vis de V_i , en condition témoin (en bleu) ou après un traitement à l'ASM (en orange), au PhP (en rouge), au Kendal (en violet) ou au COS-OGA (en gris). Trois séries de tests sont représentées, la série Vi-B04_EAPK pour laquelle les traitements Eau, ASM, PhP et Kendal ont été testés, la série Vi-B04_EAPC pour laquelle les traitements Eau, ASM, PhP et COS-OGA ont été testés et la série Vi-B04_EA pour laquelle les traitements Eau et Bion ont été testés. Les groupes, représentés par les lettres (a à e) sont issus de la comparaison par paires (SNK.test) selon l'effet génotype.

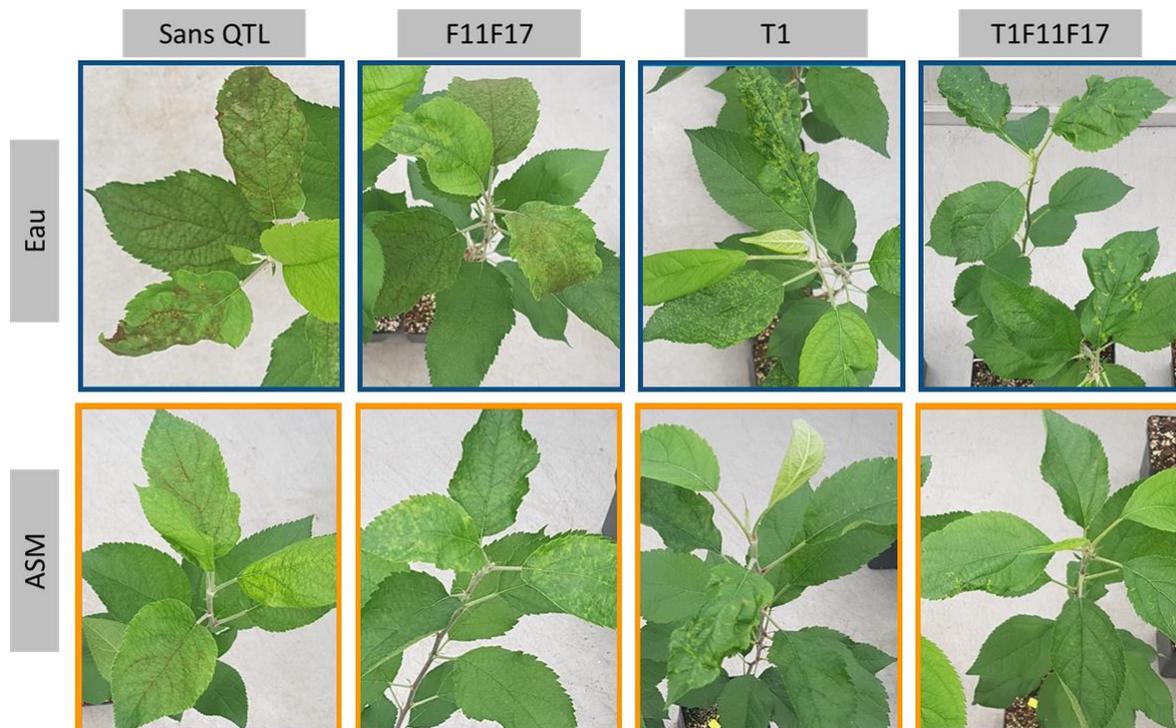


Figure 20 : Symptômes de maladie (tâches sporulantes) et de résistance (chlorose/crispation des feuilles) observables dans les représentants des classes de QTLs, après inoculation avec *Vi* (souche EU-B04), dans la condition témoin (encadré bleu) ou après traitement à l'ASM (encadré orange).

Des représentants des 4 classes phénotypiques (sansQTL, F11F17, T1, T1F11F17) ont été testés pour leur sensibilité à la tavelure (souche EU-B04) après traitement à l'eau ou aux 4 SDP suivants, ASM, PhP, Kendal, COS-OGA.

Les résultats mettent en évidence une influence forte des facteurs génétiques dans la variation de la sensibilité à la tavelure entre les différentes classes de QTLs (**Figure 19**). En effet, dans la condition témoin, les niveaux de sensibilité varient entre 0 et 150 et décroissent avec l'augmentation des résistances apportées par les QTLs : $AUDPC(\text{sansQTL}) > AUDPC(\text{F11F17}) > AUDPC(\text{T1}) > AUDPC(\text{T1F11F17})$. Les témoins de sensibilité, Gala et Golden Delicious, présentent des niveaux de sensibilité équivalents voir inférieurs à la classe sansQTL. Les génotypes des deux classes qui portent le QTL qT1 sont globalement peu sensibles, voire pratiquement totalement résistants pour ceux de la classe T1F11F17. Le parent TN10-8 présente un niveau de sensibilité attendu, potentiellement équivalent à la classe T1, et le parent Fiesta un niveau potentiellement équivalent à la classe F11F17, en s'affranchissant de la présence d'autres résistances dans le fond génétique de ces génotypes.

Les photographies des feuilles traitées à l'eau après inoculation (**Figure 20**) illustrent les symptômes de maladie et de résistance qui apparaissent sur les feuilles des génotypes des

différentes classes de QTLs. Les feuilles de la classe sansQTL sont couvertes de taches sporulantes et présentent des brûlures, dues à la déshydratation des feuilles après la perforation de la cuticule au moment de la sporulation. Les feuilles de la classe F11F17 sont couvertes partiellement de tavelure et des chloroses diffuses sont observables dans certaines parties des feuilles. Ces chloroses sont interprétées comme des symptômes de résistance de la feuille. Les feuilles des classes T1 et T1F11F17 ne présentent pas de tavelure mais des chloroses en étoile, assez caractéristiques de l'expression du QTL qT1 et une crispation importante. Des nécroses sont présentes au centre des chloroses en étoile sur les feuilles de la classe T1. Ces nécroses sont probablement dues à une réaction hypersensible qui déclenche la mort cellulaire localement (Bus et al., 2010; Laloï et al., 2017).

L'application d'ASM et de PhP diminue fortement la sensibilité de l'ensemble des génotypes tandis que le Kendal et le COS-OGA ne semblent pas avoir d'effet. Les niveaux de sensibilité après traitement à l'eau ou avec ces deux derniers SDP sont équivalents (non significatifs d'après les résultats d'analyse de variance). Après traitement à l'ASM ou au PhP, les variations des niveaux de sensibilité entre les classes de QTLs est semblable à celui de la condition témoin, l'ordre des classes selon leur sensibilité est inchangé. Les génotypes des classes T1 et T1F11F17 sont, pour la plupart, totalement résistants. La surface des tâches sporulantes diminue sur les feuilles des classes sansQTL et F11F17 et les symptômes de résistances semblent atténués après un traitement à l'ASM. L'atténuation des symptômes de résistance pourrait illustrer une interaction potentielle entre le traitement SDP et l'expression des résistances liées aux QTLs.

c- Variabilité de la sensibilité à *Vi* et *Ea* dans une collection de variétés

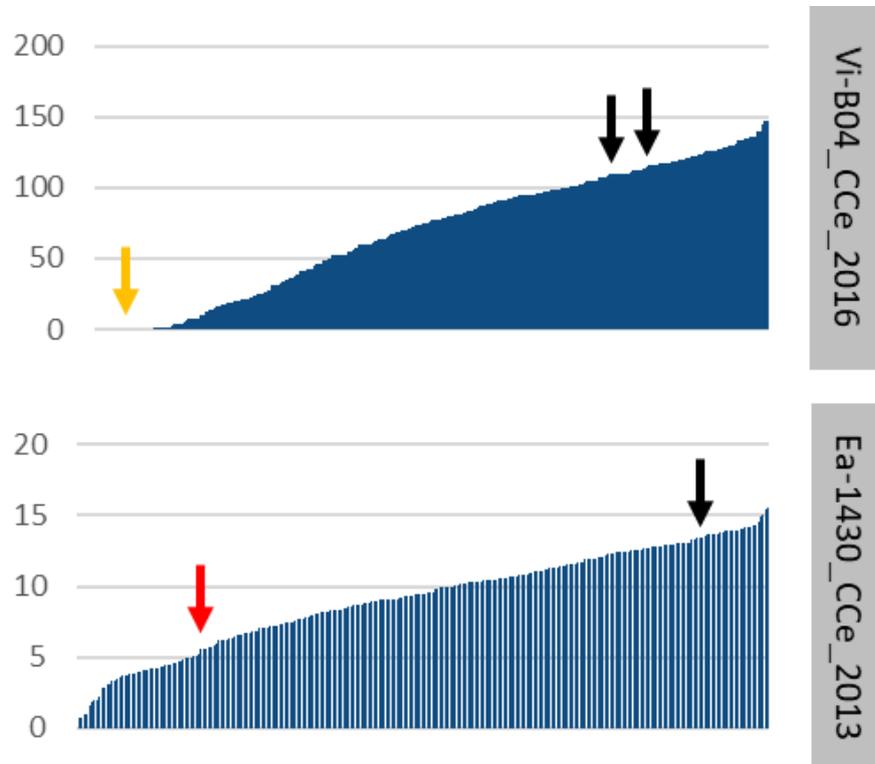


Figure 21 : Gammes de sensibilité des variétés de la CCe vis-à-vis de *Vi* (Vi-B04_CCe_2016) et de *Ea* (Ea-1430_CCe_2013). TN10-8 est représenté par une flèche orange, Fiesta par une flèche rouge et les témoins sensibles par une flèche noir.

La core collection complète de 400 variétés (CCe) a d'abord été évaluée pour sa sensibilité aux deux agents pathogènes sans traitement SDP. Les niveaux de sensibilité à *Vi* et *Ea* varient de 0 à 150 et de 0 à 15 respectivement (**Figure 21**). Les profils de variabilité de la sensibilité à *Vi* ou *Ea* dans la collection sont semblables à ceux de la descendance, avec une proportion de génotypes très résistants supérieure dans le test de sensibilité à la tavelure par rapport au feu bactérien. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que globalement moins d'allèles de résistance ont été sélectionnés pour la résistance à *Ea* par rapport à *Vi*. Le feu bactérien est une maladie apparue en Amérique du Nord et introduite en Europe dans les années 1950 (Peil et al., 2009), alors que la tavelure est une maladie qui a vraisemblablement suivi la domestication du pommier puis sa migration le long des routes de la soie et son introduction

en Europe (Gladieux et al., 2010). Les pressions de sélection exercées par les deux maladies sur les populations de pommier au cours des siècles sont donc notoirement différentes. Malgré la taille de l'échantillonnage, le nombre de gènes majeurs et/ou de QTL de résistance au feu bactérien est donc limité dans cette collection de variétés anciennes de pommiers à couteau.

Un sous-ensemble de 32 variétés (CCe 32) a ensuite été testée pour sa sensibilité aux deux maladies après traitement à l'eau ou à l'ASM (Figure 22). Les résultats montrent que l'application d'ASM réduit fortement la sensibilité à *Vi* des variétés de ce sous-ensemble, tandis que la sensibilité à *Ea* est moins fortement réduite quelle que soit la concentration en ASM employée (0,2 g.L⁻¹ dans le test Ea-1430₃₂_1 ou 0,4 g.L⁻¹ dans le test Ea-1430₃₂_2). Les valeurs de sensibilité au feu bactérien restent élevées, avec une moyenne autour de 7 dans le test Ea-1430₃₂_1, après un traitement à l'ASM. La corrélation (R) entre les deux tests phénotypiques de la CCe_32 par rapport à *Vi* et à *Ea* est de 0,9 et 0,4 respectivement pour la condition témoin et 0,7 après traitement à l'ASM (Figure S3 et Figure S4). La diminution de la concentration en ASM entre les répétitions 1 et 2 des tests phénotypiques Vi-B04₃₂, augmente globalement la sensibilité des génotypes après traitement. Les niveaux de sensibilité des génotypes après traitement sont fortement corrélés entre les deux répétitions donc les génotypes les plus sensibles sont retrouvés quelle que soit la concentration en ASM. Par contre, la corrélation entre les niveaux de sensibilité dans la condition témoin des répétitions 1 et 2 des tests phénotypiques Ea-1430₃₂ est faible. De plus, malgré l'augmentation de la concentration en ASM, les génotypes sont plus sensibles dans la répétition Ea-1430₃₂_2 après traitement. Les fortes chaleurs survenues pendant le test Ea-1430₃₂ ont probablement favorisé la croissance bactérienne et donc le développement de la maladie malgré les résistances génétiques des variétés et les résistances induites par l'ASM. Tous les génotypes sont devenus sensibles du fait des conditions, ce qui peut expliquer le faible niveau de corrélation (0,4) entre les répétitions des tests phénotypiques dans la condition témoin. Le niveau de corrélation entre les génotypes est supérieur après traitement (0,7) probablement parce que le traitement à l'ASM rétablit le classement des génotypes.



Figure 23 : Symptômes (nécroses évolutives) observables dans la descendance, après inoculation avec *Ea*, dans la condition témoin (encadré bleu) ou après traitement à l'ASM (encadré orange).

Les photographies des pousses dans la condition témoin après l'inoculation illustrent les symptômes de maladie qui apparaissent sur les géotypes de la descendance (**Figure 23**). Les nécroses sont liées au développement et à la propagation des populations bactériennes de *Ea* dans les cellules du parenchyme qui accompagnent les vaisseaux de la tige. Les nécroses évoluent depuis les feuilles inoculées vers le bas de la tige pour les géotypes les plus sensibles. Après un traitement à l'ASM l'incidence de la maladie est visiblement réduite, la proportion de géotypes présentant des nécroses ainsi que la sévérité de ces dernières apparaissent clairement plus faibles sur la vue d'ensemble des plantes traitées.

Les géotypes les plus sensibles à *Vi* et *Ea* dans la condition témoin ne sont pas systématiquement les plus sensibles après le traitement à l'ASM. L'ampleur de la réduction de la sensibilité, liée au traitement ASM, dépend de la variété traitée. Ces résultats suggèrent que tous les géotypes ne répondent pas de façon similaire à l'ASM.

2- Efficacité de protection des résistances génétiques et induites par les SDP

a- Méthode de calcul de l'efficacité de protection des résistances

Pour évaluer le gain du cumul des résistances génétiques et induites par les SDP, l'efficacité de protection de la combinaison des résistances a été comparée à l'efficacité de protection individuelle des résistances génétiques ou induites. Pour cela les calculs d'efficacité ont été réalisés sur les données de phénotypage disponibles pour la descendance et la CcE_32 (détaillées dans le chapitre II). La formule utilisée pour l'ensemble des calculs d'efficacité peut s'écrire de manière générique :

Efficacité (Résistance A)

$$= \frac{\mu(\text{AUDPC (sans Résistance A)}) - \mu(\text{AUDPC (avec Résistance A)})}{\mu(\text{AUDPC (sans Résistance A)})} \times 100$$

où $\mu(\text{AUDPC (sans Résistance A)})$ représente la moyenne des AUDPC des génotypes non « porteurs » de la résistance A (que celle-ci soit d'origine génétique ou induite par SDP).

Pour la descendance, les données de génotypage des SNP disponibles (détaillées dans le chapitre IV) ont permis de définir le groupe de génotypes porteurs des allèles favorables au niveau des principaux QTLs qT1, qF11 et qF17 pour la tavelure et le QTL qF7 pour le feu bactérien et le groupe de génotypes cumulant les allèles de sensibilité au niveau de ces QTLs (groupe T1F11F17- et groupe F7-). Pour calculer les effets individuels des résistances sans biais, le calcul de l'efficacité des résistances génétiques a été réalisé à partir des données de phénotypage des plantes traitées à l'eau uniquement. Concernant l'efficacité des résistances induites, le calcul a été effectué à partir des données de phénotypage des groupes de génotypes porteurs des allèles de sensibilité au niveau des QTLs de résistances. L'efficacité de combinaison a été calculée sur le contraste entre les génotypes sensibles traités à l'eau et les génotypes résistants (porteurs d'allèles favorables aux QTLs) traités avec un SDP. Les efficacités de protection des traitements SDP ont également été calculées dans les différentes classes de QTLs pour évaluer l'impact des résistances génétiques sur l'efficacité du traitement. Les intervalles de confiance à 5% des efficacités de protection ont été simulés par bootstrapping sur 5000 répétitions à l'aide de la fonction boot sous le logiciel R. Nous avons

considéré que l'absence de recouvrement des intervalles de confiance révèle que les efficacités sont significativement différentes entre les classes de QTLs.

Pour la CCe₃₂, aucune information sur les résistances génétiques portées par ces variétés ne sont disponibles. Le calcul d'efficacité des résistances génétiques a donc été réalisé par comparaison entre l'AUDPC de la variété la plus sensible (sélectionnée indépendamment pour les tests tavelure et feu bactérien), considérée comme cumulant un ensemble d'allèles de sensibilité et la moyenne des AUDPC des autres variétés, considérées comme porteurs d'un panel d'allèles de résistance.

b- Efficacité de protection des résistances induites par l'ASM

Tableau 5 : Efficacité de protection des résistances génétiques et/ou des résistances induites par l'ASM vis-à-vis de deux souches de *Vi*, EU-B04 (Vi-B04_1) et 09BCZ14 (Vi-Z14) et de *Ea* (Ea-1430_1) dans la descendance.

	Efficacités de protection		
	Résistances génétiques	Résistances induites	Combinaison
Vi-B04_1	93 %	33 %	99 %
Vi-Z14	83 %	83 %	94 %
Ea-1430_1	32 %	49 %	68 %

Tableau 6 : Efficacité de protection des résistances génétiques et/ou des résistances induites par l'ASM vis-à-vis de *Vi* (Vi-B04₃₂_1) et de *Ea* (Ea-1430₃₂_1) dans la CCe₃₂.

	Efficacités de protection		
	Résistances génétiques ^a	Résistances induites	Combinaison
Vi-B04 ₃₂ _1	78 %	79 %	92 %
Ea-1430 ₃₂ _1	26 %	65 %	53 %

^a La variété X08742 a été sélectionnée comme témoins de sensibilité pour la tavelure (~non porteur de résistance) et la variété X08226 a été sélectionnée pour le feu bactérien

Parmi les 266 descendants pour lesquels les données de génotypage sont disponibles, 44 génotypes (30 porteurs des allèles de résistance et 14 de sensibilité) ont été utilisés pour calculer l'efficacité des résistances génétiques vis-à-vis de *Vi* et 246 génotypes (126 porteurs

des allèles de résistances et 120 de sensibilité) vis-à-vis de *Ea*. Les résultats des calculs sont synthétisés dans le **Tableau 5**.

Les trois principaux QTLs de résistance à la tavelure qT1, qF11 et qF17 confèrent une efficacité de protection d'environ 80-90%, légèrement plus forte pour la souche EU-B04 qui ne contourne pas la résistance du QTL qT1. Le QTL de résistance au feu bactérien, qF7, assure une protection de 32% (**Tableau 5**). Dans la Cce_32, le pool de résistance de la collection confère 78% d'efficacité de protection par rapport à la tavelure et 26% pour le feu bactérien (**Tableau 6**). Dans les deux populations, les niveaux de protection apportés par les résistances génétiques sont similaires et dépendent de l'agent pathogène étudié. De plus, les variations d'efficacité entre les répétitions des tests sont faibles (différence < 14%).

Par rapport aux résistances génétiques, l'efficacité de protection des résistances induites par l'ASM est plus variable d'un test à l'autre. En effet la réduction des symptômes liées à la souche EU-B04 varie de 33 % (**Tableau 5**) à 72% (données non présentées pour les répétitions) au sein de la descendance et de 79% (**Tableau 6**) à 47% (données non présentées pour les répétitions) au sein de la collection. Globalement, l'ASM est plus efficace contre la tavelure que le feu bactérien pour les deux populations étudiées. Dans la descendance, l'efficacité de protection des QTLs est plus importante que celle de l'ASM pour la tavelure alors que pour le feu bactérien la protection apportée par l'ASM est plus importante que celle apportée par le QTL qF7 (**Tableau 5**). Cette tendance est globalement retrouvée dans la collection (**Tableau 6**).

L'efficacité de protection des résistances génétiques et induites par l'ASM combinées varient de 92% (Vi-B04_{32_1}, **Tableau 6**) à 99% (Vi-B04_1, **Tableau 5**) pour la tavelure et de 53% (Ea-1430_{32_1}, **Tableau 6**) à 68% (Ea-1430_1, **Tableau 5**) pour le feu bactérien. Excepté dans les tests Ea-1430_{32_1} et Ea-1430_2 (données non présentées), la protection apportée par la combinaison des résistances est toujours supérieure à l'efficacité des résistances individuelles.

c- Comparaison des efficacités de l'ASM et du PhP

L'efficacité de protection des résistances génétiques, seules, prédomine avec une efficacité variant de 96% (**Tableau 7**) à 100% (données non présentées pour les répétitions) dans les génotypes qui cumulent les allèles de résistance des trois QTLs qT1, qF11 et qF17. Le découpage en classes de QTL permet d'estimer l'efficacité de chaque QTL avec une protection de 24% pour les QTLs qF11 + qF17 et une protection de 75% pour le QTL qT1 seul (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Efficacité de protection des résistances génétiques et/ou des résistances induites par un SDP (ASM ou PhP) vis-à-vis de *Vi* (Vi-B04_EAPC) dans les classes de QTLs.

	Résistances génétiques			Résistances induites		Combinaison					
	F11F17	T1	T1F11F17	sansQTL	sansQTL	F11F17	T1	T1F11F17	F11F17	T1	T1F11F17
	Eau	Eau	Eau	ASM	PhP	ASM	ASM	ASM	PhP	PhP	PhP
Vi-B04_EAPC	24%	75%	96%	49%	64%	80%	99%	100%	88%	98%	100%

L'efficacité de protection des seuls SDP varie entre 49% pour l'ASM et 64% pour le PhP. Le cumul des toutes les résistances génétiques et induites par les SDP résulte en une protection totale (100%) dans cette population. Cependant, l'efficacité de protection de la combinaison des résistances semble dépendre du niveau des résistances apportées par les QTLs. En effet, l'efficacité de protection de la combinaison F11F17xSDP varie de 80% (ASM) à 88% (PhP) tandis que la combinaison T1xSDP atteint 99% (ASM) à 98% (PhP) de protection. Pour vérifier cette hypothèse les intervalles de confiance des efficacités de protection de l'ASM et du PhP ont été comparés entre les classes de QTLs après bootstrap (**Figure 24**, Annexes - **Figures S5 et S6**).

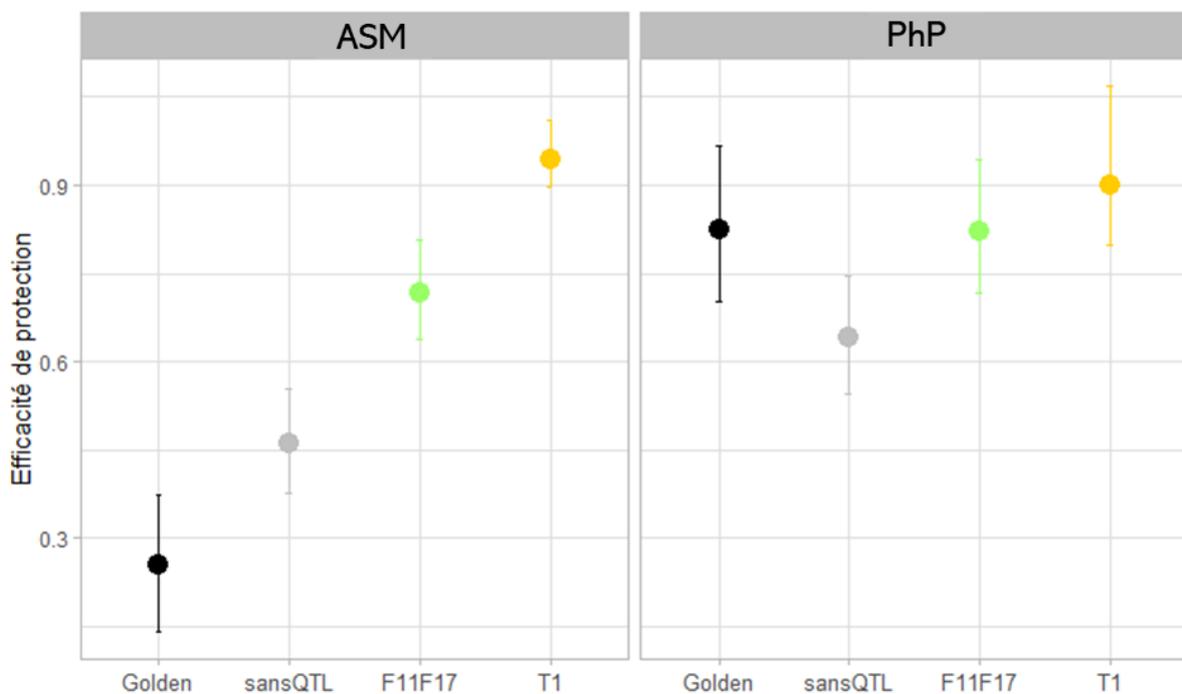


Figure 24 : Efficacités de protection de l'ASM et du PhP vis-à-vis de *Vi* (Vi-B04_EAPC) en fonction des classes de QTLs. Les barres représentent les intervalles de confiance, calculés par bootstrap, autour de la moyenne de l'efficacité du SDP dans chaque classe.

L'efficacité de protection de l'ASM varie significativement entre les classes de QTLs. L'efficacité de l'ASM est en moyenne de 40% pour la classe sansQTL et le génotype sensible Golden Delicious. La variété Gala n'a pas été retenue comme témoin sensible car les résultats des tests pathologiques montrent que ce génotype est partiellement résistant à la tavelure.

L'efficacité de l'ASM est significativement plus importante dans la classe F11F17 (~80%) par rapport à la classe sansQTL et plus importante dans la classe T1 (>90%) par rapport aux classes sansQTL et F11F17. L'efficacité de protection de l'ASM augmente significativement avec le niveau de résistance apporté par les QTLs au sein des génotypes. Au contraire, l'efficacité du PhP est globalement supérieure à celle de l'ASM et ne varie plus significativement entre les différentes classes de QTL (seule la différence entre les classes sansQTL et T1 est significative). Le PhP semble donc agir plus indépendamment du fond génétique des génotypes dans le test phénotypique Vi-B04_EAPC alors que l'ASM semble interagir davantage avec des mécanismes de défense intrinsèques aux génotypes et/ou modulés différenciellement par les QTLs.

3- Corrélations entre les niveaux de résistance

Pour étudier l'interactivité entre les résistances génétiques et induites par les SDP, des analyses de corrélations ont été menées à partir des données de phénotypage disponibles sur les différentes populations étudiées (descendance et CcE_32). Les coefficients de corrélation de Pearson ont été calculés entre les moyennes des AUDPC des génotypes traités à l'eau et les moyennes des AUDPC des mêmes génotypes traités avec l'ASM. Concernant les données de la descendance, des estimations des valeurs moyennes génotypiques, appelées BLUP (Best linear unbiased predictor) ont été utilisées pour traduire les AUDPC après correction des effets environnementaux (décrit dans le chapitre IV). Une corrélation parfaitement linéaire entre les niveaux de sensibilité avec et sans traitement ASM traduirait une simple additivité des résistances génétiques et induites par les SDP. Au contraire, une décorrélacion traduit une interactivité potentielle entre ces résistances, d'autant plus forte que la corrélation diminue.

Au sein de la descendance, la corrélation entre les niveaux de sensibilité des génotypes dans la condition témoin et après un traitement à l'ASM suit globalement une tendance linéaire pour la tavelure et le feu bactérien (**Figure 25**). Les niveaux de sensibilité des génotypes après traitement à l'ASM sont plus faibles et le traitement modifie peu la variabilité de la sensibilité des génotypes. En effet, les génotypes les plus résistants en condition témoin sont les génotypes les plus résistants après le traitement à l'ASM. Les coefficients de corrélation de Pearson varient entre 0,63 (Vi-Z14) et 0,87 (Vi-B04_1) pour la tavelure et 0,55 pour le feu

bactérien, correspondant à des niveaux de corrélation intermédiaires à élevés. Cependant, si on se représente mentalement une droite de régression, la dispersion importante de certains points autour de la droite de suggère une plus forte interactivité entre certains génotypes et l'ASM, en particulier ceux qui présentent une sensibilité élevée avec le témoin eau (**Figure 25**).

Afin d'évaluer l'interaction entre les résistances génétiques impliquées dans les QTLs et les résistances induites par l'ASM, des filtres de couleurs, représentant qT1, qF11, qF17 pour la tavelure et qF7 pour le feu bactérien sont indiqués dans la **Figure 25**. La dispersion des points autour de la droite de régression potentielle (non représentée) semble dépendre du niveau de sensibilité mais ne permet pas de conclure sur l'interaction entre ces QTLs et le traitement ASM.

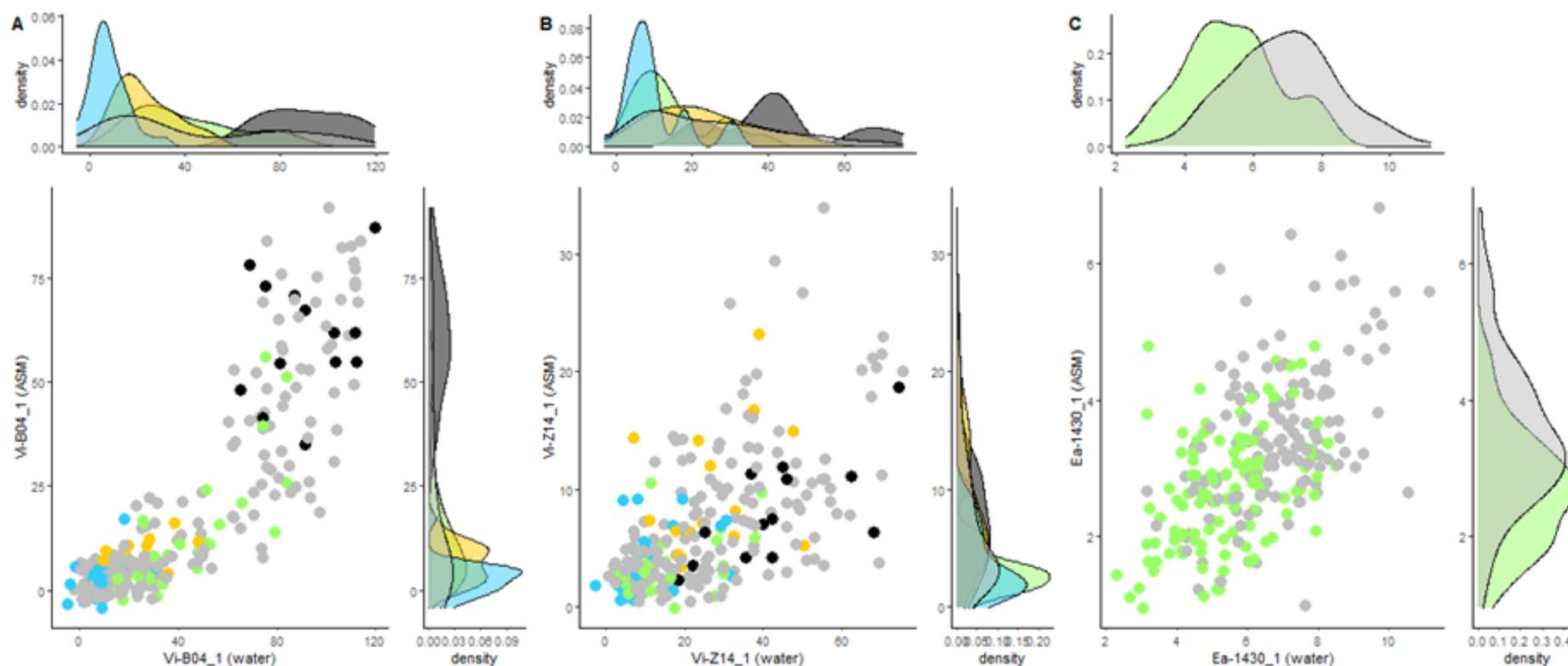


Figure 25 : Corrélation entre les niveaux de sensibilité (BLUP des AUDPC) des génotypes de la descendance vis-à-vis de deux souches de *Vi*, EU-B04 (A, Vi-B04_1) et 09BCZ14 (B, Vi-Z14_1) et de Ea (C, Ea-1430_1). Les distributions des génotypes traités à l'eau sont représentées dans la partie haute de chaque graphique et dans la partie droite pour les génotypes traités à l'ASM. Les données des génotypes de la classe "sansQTL" sont représentées en noir, la classe "T1" en orange, la classe "F11F17" en vert, la classe "T1F11F17" en bleu pour la tavelure et la classe "F7" en vert pour le feu bactérien. Les génotypes portant d'autres combinaisons de QTLs sont représentés en gris.

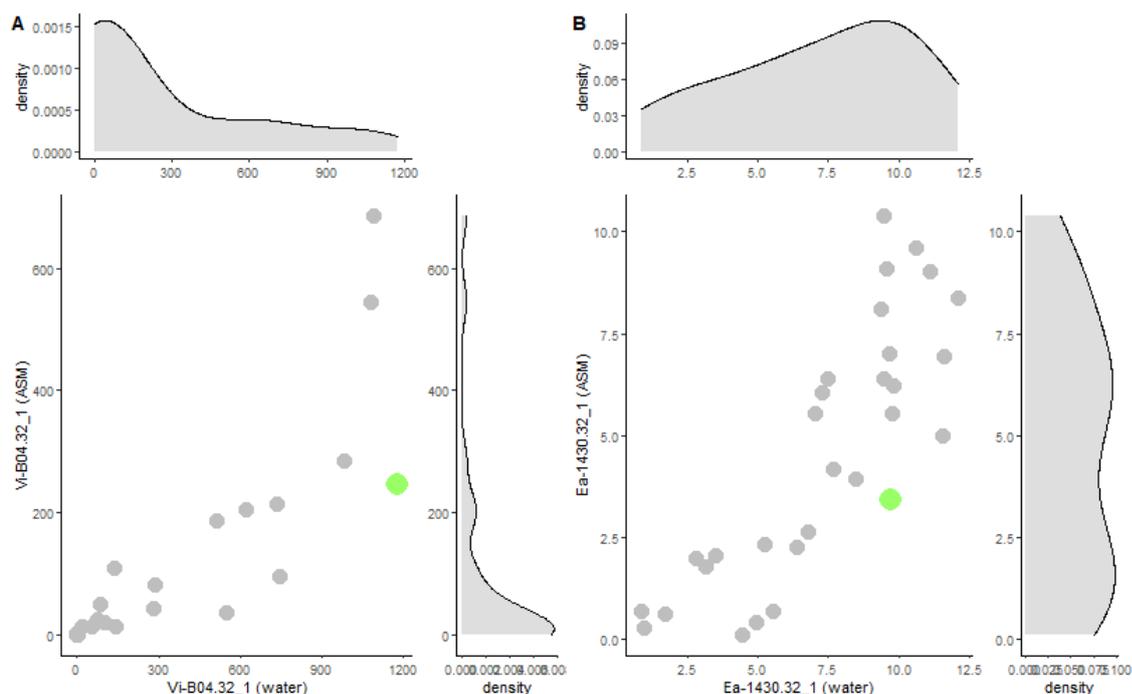


Figure 26 : Corrélation entre les niveaux de sensibilité (AUDPC) des géotypes de la Cc₃₂ vis-à-vis de *Vi*, EU-B04 (A, Vi-B04_{32_1}) et de *Ea* (B, Ea-1430_{32_1}). Les distributions des géotypes dans la condition témoin sont représentées dans la partie haute de chaque graphique et dans la partie droite pour les géotypes traités à l'ASM. Les géotypes X08742 et X08226, considérés comme témoins de sensibilité pour la tavelure et le feu bactérien respectivement, sont représentés en vert.

Au sein de la collection Cc₃₂, des observations similaires à celles décrites pour la descendance peuvent être faites. Dans les deux tests, la régression entre les niveaux de sensibilité dans la condition témoin et après traitement à l'ASM suit une tendance linéaire avec une dispersion des niveaux de sensibilité après traitement à l'ASM supérieure pour les géotypes les plus sensibles (**Figure 26**). Contrairement à la descendance pour laquelle les niveaux de corrélation sont plus faibles pour le feu bactérien, dans la Cc₃₂, les coefficients de corrélation, entre les niveaux de sensibilité après un traitement à l'eau ou à l'ASM, sont élevés pour les deux maladies soient 0,92 pour Vi-B04_{32_1} et 0,83 pour Ea-1430_{32_1}.

4- Discussion chapitre III

Dans ce premier chapitre, nous nous sommes intéressés à l'efficacité de combinaison des résistances génétiques et induites par les SDP vis-à-vis de la tavelure et du feu bactérien ainsi qu'à la relation entre ces deux types de résistances. Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la combinaison des résistances aboutit à une meilleure protection que l'une ou l'autre des résistances séparément. L'efficacité de protection de l'ASM varie en fonction des résistances génétiques mais la contribution à l'interactivité entre les résistances génétiques et induites par ce SDP semble d'avantage associée aux génotypes les plus sensibles. Ces résultats sont discutés dans les deux paragraphes de cette partie.

a- Les résistances génétiques et induites par les SDP ne sont pas antagonistes pour la protection contre la tavelure et le feu bactérien

La combinaison des résistances génétiques et induites par les SDP permet une meilleure protection contre *Vi* et *Ea*, sur les populations étudiées, par rapport à chacune des résistances séparées. Il n'y a pas d'interaction négative entre ces résistances qui conduirait à l'observation d'une plus faible protection par la combinaison des résistances. Ce constat peut paraître attendu mais le cumul de résistance peut aboutir dans certains cas à une augmentation de la sensibilité des génotypes, dont plusieurs exemples ont été décrits dans le cadre de la résistance à la chenille *Spodoptera exigua* de la tomate et au champignon *Rhizoctonia solani* chez *Brachypodium distachyon* (Poacée) après un traitement à l'ASM (Thaler et al., 2002; Koornneef and Pieterse, 2008; Kouzai et al., 2018). L'interaction négative observée dans ces exemples est due à un antagonisme dans la régulation des voies de signalisation médiée par les phytohormones, la plus référencée étant celle qui confronte les voies de l'acide salicylique (SA) et l'acide jasmonique (JA) (Caarls et al., 2015).

La **Figure 27** représente de façon schématique et simplifiée les différentes relations de flux métaboliques qui pourraient être impliquées dans la combinaison des résistances. Les voies de défenses activées par les résistances génétiques et induites par les SDP seraient donc soit indépendantes, soit interactives. Si les voies sont indépendantes, les flux métaboliques restent inchangés dans la combinaison comme dans les résistances individuelles. On peut considérer

qu'ils s'additionnent et qu'il y a complémentarité stricte ($1+1=2$). Si les voies de défenses sont interactives, elles peuvent être en synergie (interaction positive) si les flux sont exacerbés par la combinaison des résistances ($1+1>2$), en complémentarité partielle si l'additivité entre flux est incomplète ($1+1>1<2$) ou bien en antagonisme (interaction négative) si les flux sont diminués ($1+1<1$). Enfin on pourrait évoquer la neutralisation si un des deux flux est annulé par la combinaison des résistances ($1+1=1$). L'antagonisme entre les résistances peut apparaître dans le cadre de la compétition pour des précurseurs communs ou de co-régulation de voies métaboliques. Inversement, le traitement SDP pourrait favoriser la production de précurseurs utilisés dans la voie de défense modulée par un QTL, ce qui pourrait augmenter la production de molécules de défense en présence de l'allèle favorable du QTL (et inversement pour l'allèle défavorable).

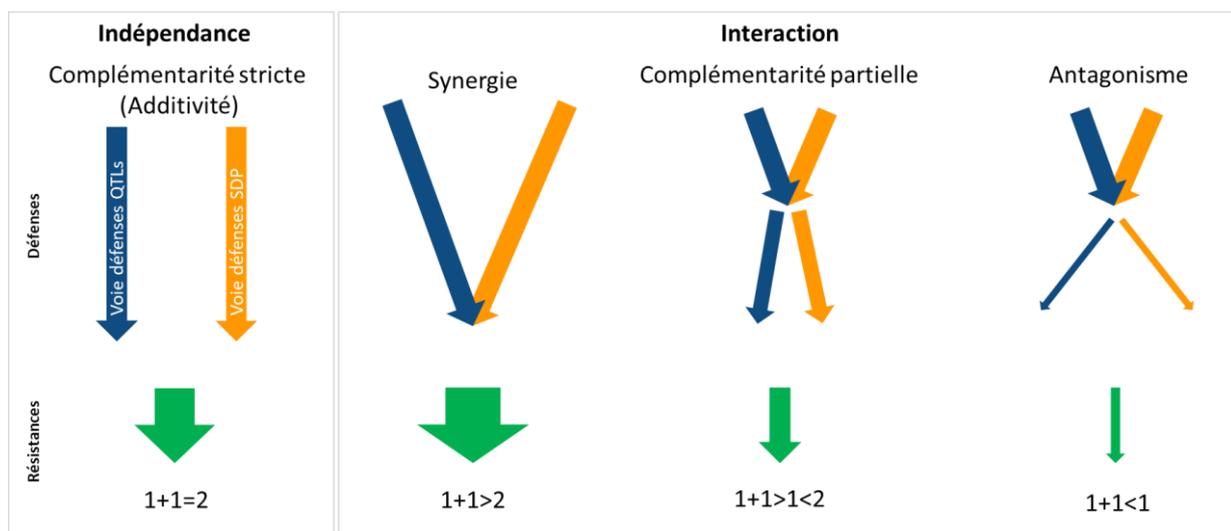


Figure 27 : Schéma hypothétique des flux métaboliques impliqués dans la combinaison des résistances génétiques et induites par les SDP.

Dans le cas de la combinaison entre les résistances génétiques du pommier à *Vi* et *Ea* et les résistances induites par l'ASM ou le PhP, les résultats suggèrent que l'effet des résistances combinées est au moins supérieur à l'effet des résistances individuelles ($1+1>1$) donc d'après les relations précédemment décrites entre les flux métaboliques, les voies de défenses activées ne sont pas antagonistes. Les voies de défenses impliquées dans les résistances génétiques et induites par les SDP sont donc additives, synergiques ou partiellement complémentaires.

Sachant que l'ASM est un analogue de SA et que les voies de défenses activées par les résistances génétiques et induites par l'ASM ne sont pas antagonistes, nous pouvons faire l'hypothèse que les défenses liées aux résistances génétiques sont probablement soit indépendantes, soit liées à la voie SA.

b- Les résistances génétiques et induites par les SDP sont probablement indépendantes et interactives : complémentarité stricte, partielle et/ou synergie ?

Du fait de l'efficacité de protection de chaque résistance séparément, il est difficile de déterminer si l'effet des résistances combinées est supérieur à l'effet des résistances séparément ($1+1>1<2$) ou la somme de ces résistances ($1+1\geq 2$). Par contre, la variabilité de l'efficacité de l'ASM en fonction des classes de QTLs suggère une interactivité entre les résistances génétiques et les résistances induites. La tendance linéaire de la régression que l'on pourrait tracer entre la sensibilité des génotypes dans la condition témoin et après un traitement à l'ASM montre que les résistances génétiques et induites ont des effets globalement additifs, donc activent probablement des voies indépendantes. Mais la contribution des génotypes les plus sensibles à l'interactivité entre les résistances suggèrent qu'une partie des voies de défense modulées par les résistances sont partiellement complémentaires voire synergiques. La variabilité de l'efficacité de l'ASM en fonction des génotypes a déjà été démontrée (Walters et al., 2013) mais les résultats présentés dans cette thèse montrent que l'efficacité dépend en partie des résistances génétiques. Il semble donc que les résistances génétiques et les résistances induites par l'ASM soient globalement additives et ponctuellement interactives (partiellement complémentaires ou synergiques) en fonction des résistances génétiques étudiées. Dans la plupart des tests phénotypiques, la combinaison des résistances n'aboutit pas à une protection totale (même si elle s'en approche). L'effet des résistances combinées serait donc inférieur à la somme des effets individuels et les résistances seraient plutôt partiellement complémentaires que synergiques si elles ne sont pas indépendantes.

L'efficacité de l'ASM semble dépendre des résistances génétiques alors que l'efficacité du PHP serait plus constant quel que soit le fond génétique. Une trop forte dose du PHP pourrait masquer d'éventuelles interactions entre l'efficacité du PHP et le fond génétique mais si les

différences entre l'ASM et le PhP ne sont pas liées à un effet de concentration alors ces résultats suggèrent que les mécanismes activés par ces deux SDP pourraient être différents. Ceci est cohérent avec les résultats de Gaucher et al., (2020) démontrant, sur la base de l'expression de 28 gènes de défenses, que l'ASM active clairement les gènes de la voie SA et protéines PR alors que le PhP ne les active que faiblement mais module les gènes de la voie des phénylpropanoïdes. De plus, le PhP a été décrit comme ayant aussi une activité biocide sur différents agents fongiques. Vis-à-vis de *Vi*, cela ne semble pas être le cas, des tests de germination de spores en présence de PhP réalisés dans l'équipe ayant montré que le produit n'affecte pas cette étape de l'infection (Brisset, communication personnelle). Cependant il faudrait tester l'effet du PhP sur la croissance du mycélium pour définitivement rejeter l'hypothèse d'un effet biocide. S'il s'avérait que le PhP n'a pas d'effet biocide sur *Vi* et *Ea* mais seulement un effet SDP, alors les résultats suggèrent que les défenses activées par les résistances génétiques et les résistances induites par le PhP sont globalement indépendantes. D'éventuelles complémentarités partielles entre une partie des résistances génétiques et les résistances induites par le PhP ne sont pas à exclure mais la variabilité de l'efficacité du PhP semble moins dépendre du fond génétique des génotypes que l'ASM. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour affirmer l'indépendance des voies de défenses associées aux résistances.

c- Hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la combinaison des résistances génétiques et des résistances induites par l'ASM

La difficulté dans l'étude des interactions entre les résistances génétiques et induites par les SDP repose sur la chronologie de la mise en place des défenses. En effet les résistances génétiques peuvent intervenir dans la reconnaissance, la signalisation ou la mise en place des défenses. De plus ces mécanismes peuvent être activés constitutivement ou induits par une infection. En appliquant l'ASM avant l'inoculation, la chronologie de la mise en place des défenses pourrait être schématisée comme dans la **Figure 28**.

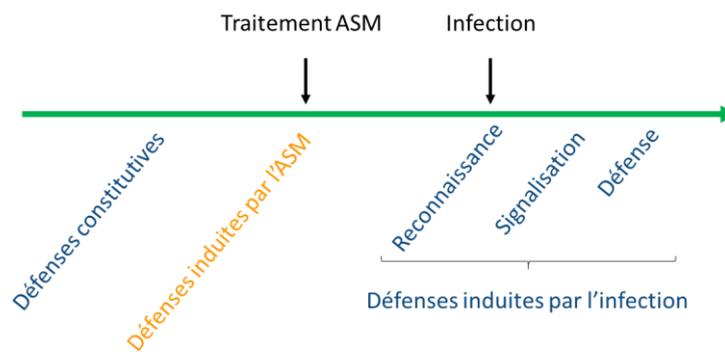


Figure 28 : Chronologie de la mise en place des défenses constitutives et induites par l'ASM puis l'infection.

L'interaction entre les résistances génétiques et induites par l'ASM peut donc être liée à l'interaction entre les voies de défenses constitutives et induites par l'ASM et/ou induites par l'ASM et induites par l'infection.

Premier postulat : Si les résistances génétiques sont impliquées dans des voies de défense activées constitutivement, alors l'efficacité de l'ASM peut varier en fonction de ces niveaux de défenses constitutives.

La **Figure 29** représente les différentes hypothèses sur la combinaison des résistances génétiques constitutives et les résistances induites par l'ASM sur trois géotypes théoriques ayant des niveaux croissants de résistance constitutive. Le niveau de sensibilité de chaque géotype est représenté en gris et le niveau de résistance (génétique en bleu et induit par l'ASM en orange) est représenté comme la différence entre la sensibilité maximum et la sensibilité du géotype. En effet nous avons considéré que la sensibilité observée se traduit par une réduction de la sensibilité maximum théorique du fait de l'expression de résistances. Ainsi nous avons développé trois situations contrastées en fonction du lien entre les niveaux de résistances génétiques constitutives et l'efficacité de l'ASM :

- **L'efficacité de l'ASM est variable selon les géotypes mais indépendante du niveau de résistances constitutives**, ce qui suggère une indépendance entre voies de défense impliquées. La conséquence phénotypique est un déclassement des géotypes les plus résistants après traitement. La variabilité de l'efficacité de l'ASM est probablement liée à un facteur génétique non impliqué dans la résistance constitutive.

- **L'efficacité de l'ASM est constante quel que soit le niveau de résistances constitutives.** Dans cette situation, l'efficacité de l'ASM est corrélée au niveau de résistance constitutive mais les voies de défenses sont probablement indépendantes (complémentarité stricte).
- **L'efficacité de l'ASM est proportionnelle au niveau de résistances constitutives.** Les voies de défenses associées à ces résistances sont probablement interactives (complémentarité partielle ou synergie).

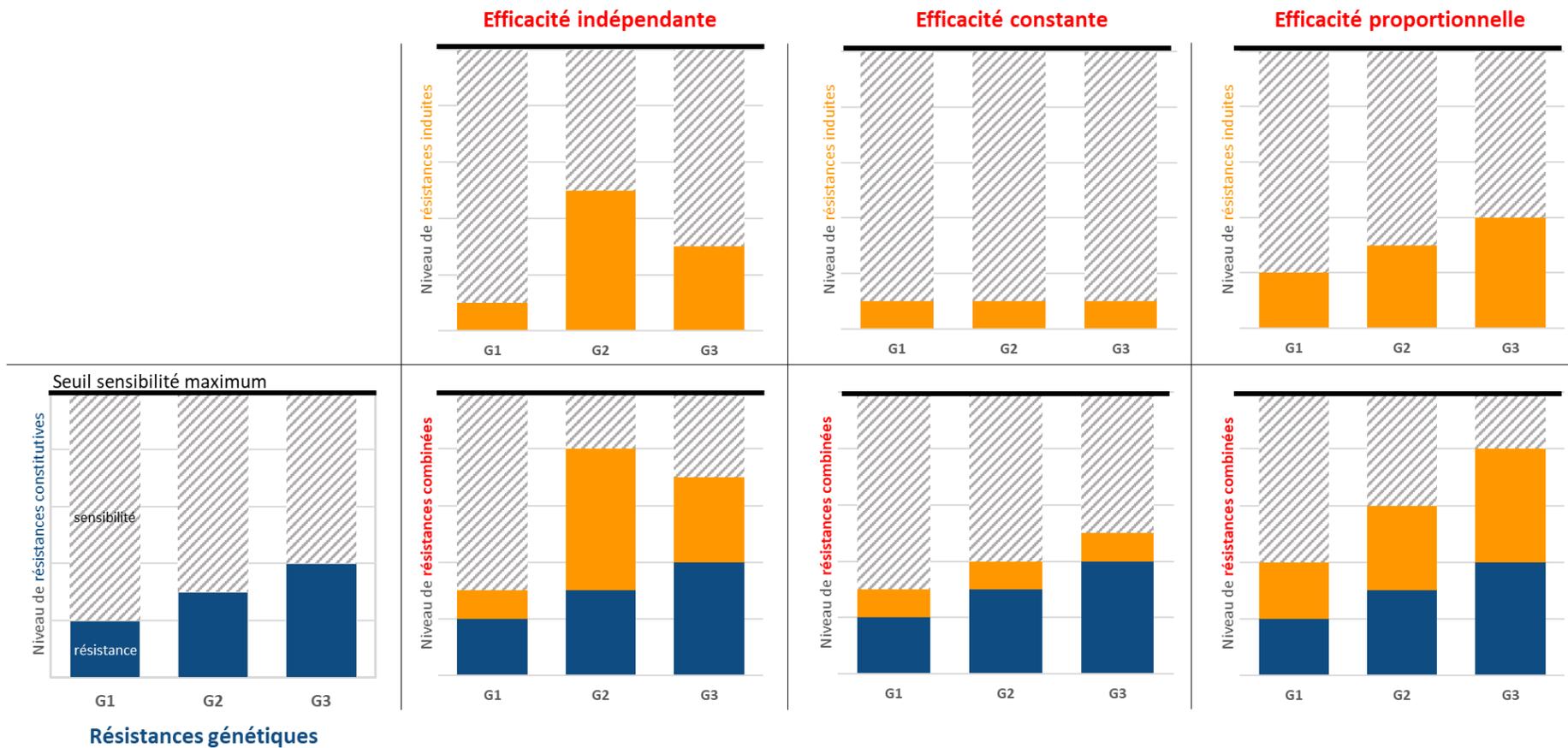


Figure 29 : Hypothèses sur le lien entre les résistances génétiques et induites par les SDP en fonction de la variabilité du niveau de résistance induit par les SDP (en orange) et selon le niveau de défenses constitutives apportées par les résistances génétiques (en bleu).

D'autres situations pourraient être détaillées comme par exemple une efficacité de l'ASM qui serait inversement proportionnelle aux résistances génétiques constitutives, c'est-à-dire une complémentation par l'ASM des résistances génétiques dans les génotypes sensibles.

Dans le cas de la combinaison des résistances génétiques à la tavelure ou au feu bactérien et induites par l'ASM, le classement des génotypes en fonction de leur sensibilité varie peu après un traitement à l'ASM et l'efficacité de l'ASM varie en fonction de la résistance des génotypes. Ces résultats suggèrent que si les résistances génétiques étudiées modulent les niveaux de défenses constitutives, alors l'efficacité de l'ASM serait constante ou proportionnelle. La comparaison de l'efficacité des résistances génétiques entre les génotypes dans la condition témoin et après un traitement à l'ASM permet d'évaluer le gain réel de résistance. Ces calculs ont été réalisés à titre d'exemple pour comparer les niveaux de résistances génétiques et induites entre les classes sansQTL et F11F17 dans le test Vi-B04_EAPC pour lesquels l'efficacité de l'ASM a été décrite comme significativement différente (**Figure 24**). Les résultats présentés dans la **Figure 30** indiquent que le gain de résistance apporté par l'ASM est supérieur dans la classe sansQTL par rapport à la classe F11F17. L'efficacité de l'ASM calculée comme le ratio $(AUDPC_{Eau} - AUDPC_{ASM} / AUDPC_{Eau})$ est bien proportionnelle au niveau des résistances génétiques dans ces deux classes mais le gain de résistance est inversement proportionnel. Nous n'irons pas plus loin dans les multiples combinaisons de calculs car cette situation suppose que les résistances induites sont apposées aux résistances génétiques qui modulerait des voies de défense uniquement constitutives selon notre premier postulat, mais la situation est très certainement plus complexe.

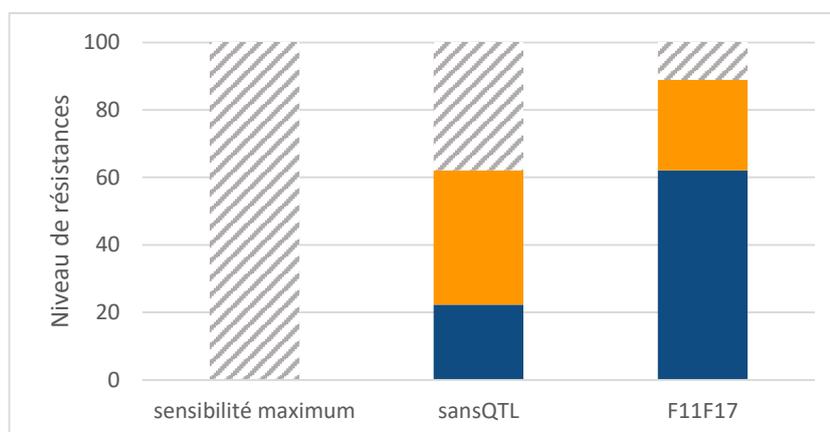


Figure 30 : Comparaison des niveaux de résistances génétiques (en bleu) et induites (en orange) entre la classe sansQTL et la classe F11F17 dans le test phénotypique Vi-B04_EAPC.

Second postulat : Inversement si on considère que les voies de défense associées aux résistances génétiques ne sont activées qu'après l'infection, alors l'ASM peut interagir sur les voies de défense de ces résistances.

Les modèles de flux métaboliques présentés par Tsuda et al., (2009) ont été adaptés pour explorer l'interactivité entre les résistances induites par l'ASM et les résistances génétiques induites par l'infection (**Figure 31**). Dans cette représentation le signal « input » correspond à des PAMP ou des effecteurs fongiques ou bactériens qui sont perçus par des récepteurs au niveau des cellules végétales lors d'une infection, déclenchant des voies de signalisation jusqu'à la mise en place de défense, par l'intermédiaire d'un réseau de réactions représentées par des flèches. Ces dernières sont connectées par des ronds correspondant aux connexions, gènes ou composés impactés par les différents flux. L'ensemble du réseau aboutit à la production par les plantes de composés de défense (triangles). Ces composés, qui sont perçus, transformés ou dégradés par l'agent pathogène (carré), affectent leurs capacités d'infection et inhibent leur développement. Le niveau des résistances, associées à chaque flux, est traduit par la flèche « output ». Nous avons choisi de représenter deux hypothèses de mécanisme expliquant l'interaction des voies de défenses, associées aux résistances génétiques et induites par l'ASM, avec l'exemple de deux flux métaboliques. Ces flux sont associés au QTL qT1 d'une part (secteur en rouge) et aux QTLs qF11 et qF17 (secteur en bleu). Les voies modulées par les résistances génétiques sont considérées comme fixes et la **Figure 31** présente deux modulations des flux métaboliques qui pourraient être déclenchés par l'ASM (flèches oranges).

Dans la première hypothèse, **les défenses activées par l'ASM interviennent en amont des voies impliquées par les QTLs avec un large impact sur le métabolisme**. L'application d'ASM exacerbe toutes les voies avalées, dont celles des QTLs, indifféremment entre la classe T1 ou F11F17, mais sans lien direct avec le mécanisme des QTLs (Hypothèse A parties A et B, **Figure 31**). L'augmentation de l'efficacité de l'ASM, en fonction des QTLs, est donc liée au flux de la voie dans laquelle intervient le QTL. Lorsqu'il n'y a pas de QTL le débit des flux est faible, le traitement ne module que peu les voies puisque les connexions sont limitantes. Dans cette hypothèse, l'efficacité de la combinaison qT1+ASM est plus importante car le flux initial de défense lié à qT1 est plus important que celui des QTLs qF11 et qF17. L'ASM amplifie cette différence indépendamment de la nature des QTLs.

Dans la deuxième hypothèse, **les défenses activées par l'ASM interviennent dans certaines voies spécifiquement**. Si le QTL fait partie de ces voies (exemple qT1 Hypothèse B Partie A, **Figure 31**), l'efficacité de la combinaison QTL+ASM est amplifiée après l'infection. Au contraire, l'augmentation du nombre d'intermédiaires métaboliques et donc schématiquement de la distance entre les voies de l'ASM et celles d'autres QTLs dilue l'interaction par des mécanismes de compensation (exemple qF11 et qF17 Hypothèse B Partie B, **Figure 31**). Dans cette hypothèse, l'efficacité de l'ASM augmente en fonction des défenses impliquées dans les QTLs. La présence d'un QTL dans la même voie que l'ASM augmente le flux et donc l'efficacité de l'ASM, alors qu'un QTL situé dans une autre voie n'augmentera ni ne limitera l'efficacité de l'ASM. Dans cette hypothèse, l'ASM n'interagit donc qu'avec certains QTLs.

Pour explorer ces hypothèses, les effets des QTLs sur l'efficacité du traitement à l'ASM et l'effet de l'ASM sur les QTLs sont étudiés en détail dans le chapitre IV.

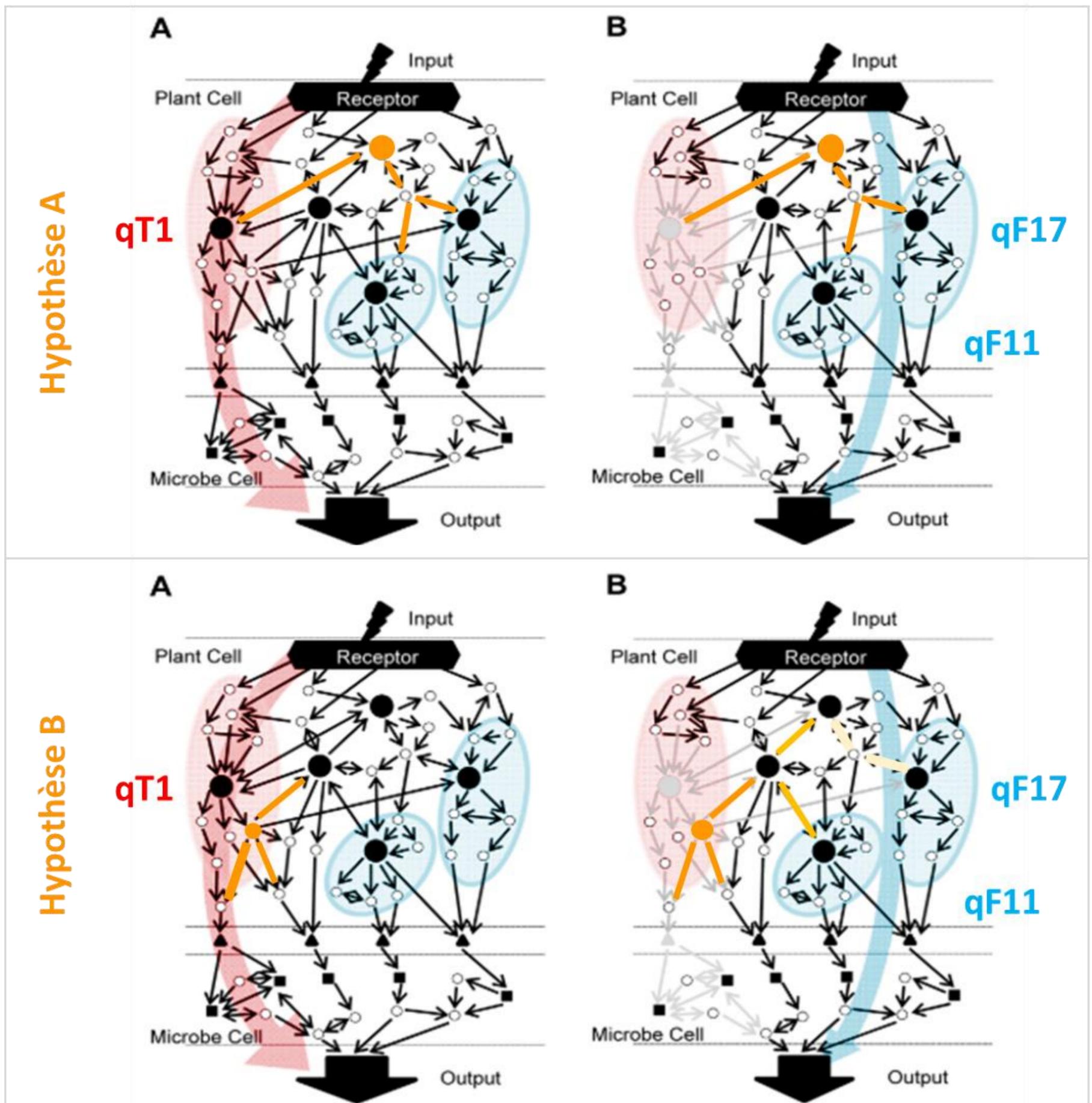


Figure 31 : Hypothèses conceptuelles sur les relations entre les voies métaboliques modulées par les QTLs de résistance à la tavelure qT1 (Partie A des hypothèses A et B, flux représenté par la flèche rouge) ou qF11 et qF17 (Partie B des hypothèses A et B, flux représenté par la flèche bleue) et les voies métaboliques modulées par l'ASM (flux représenté par la flèche orange). (Partie A) De nombreux gènes (composants du réseau de signalisation, cercles) sont fortement interconnectés dans le réseau des voies associées au QTL qT1. Le réseau n'est pas parfaitement démocratique car il y a un flux de signal primaire lorsque l'allèle favorable du QTL est présent, indiqué par une flèche rouge, lorsque le réseau est intact. (Partie B) En présence des allèles de résistance des QTLs qF11 et qF17, le flux activé principalement est représenté par la flèche bleue. (Hypothèse A) L'ASM active des voies métaboliques en amont des voies modulées par les QTLs de résistance à la tavelure et active les flux de ces voies indifféremment. Les résistances sont synergiques ou partiellement complémentaires et aboutissent à une protection proportionnelle au flux métaboliques liés aux QTLs. (Hypothèse B) les défenses activées par l'ASM interviennent dans certaines voies spécifiquement. Il peut y avoir différentes combinaisons de perturbations sectorielles en fonction de la connexion entre cette voie spécifique et celles modulées par les QTLs. Les résistances sont synergiques ou partiellement complémentaires si les voies sont connectées (Partie A) ou indépendante si les voies sont peu connectées ou avec de nombreux intermédiaires qui dilue l'effet de l'activation (Partie B, dégradé de flèche orange). Entrée (Input) : MAMPs ou effecteurs ; Sortie (output) : inhibition de la croissance des pathogènes ; Grands cercles noirs : principaux centres des secteurs de signalisation ; Triangles : composants de défense des plantes affectant directement les pathogènes ; Les flèches, cercles et triangles en grisé signifient l'interruption des connexions, des gènes et des composants de défense, respectivement. Schéma adapté de Tsuda et al., (2009)

Chapitre IV :

Déterminants génétiques impliqués
dans les résistances génétiques et les
résistances induites par les SDP

L'interactivité entre les résistances génétiques et les résistances induites par l'ASM, mise en évidence dans le chapitre précédent, suggère l'existence de mécanismes de réponse aux SDP qui diffèrent entre les génotypes. Ces mécanismes pourraient intervenir dans la perception du traitement ou en interaction avec les voies de signalisation et de défense induites ou modulées par les résistances génétiques. Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés aux facteurs génétiques à l'origine de la variabilité de l'efficacité des traitements SDP et à l'influence du traitement sur la détection des QTLs de résistance. Cette étude correspond au projet de recherche « QTLstim » financé par le département BAP d'INRAE en 2017-2018. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de l'ASM sur l'effet de QTLs de résistance à la tavelure et au feu bactérien par une approche de cartographie de QTLs menées sur la descendance. Cette partie est rédigée sous la forme d'un article qui a fait l'objet d'une publication dans le journal *Plant Disease* (Bénéjam et al., accepted). Les parties grisées correspondent à des résultats déjà montrés et discutés dans le chapitre III. La suite du chapitre présente des résultats complémentaires à l'article.

1- Acibenzolar-S-methyl and resistance quantitative trait loci complement each other to control apple scab and fire blight

Juliette Bénéjam, Elisa Ravon, Matthieu Gaucher, Marie-Noëlle Brisset, Charles-Eric Durel*,
Laure Perchepeid

UMR 1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS), INRAE, Université d'Angers, Institut-Agro Agrocampus-Ouest, SFR 4207 QuaSaV, 49071, Beaucouzé, France

*Corresponding author: Charles-Eric Durel, charles-eric.durel@inrae.fr

a- Abstract

Diversifying disease control methods is a key strategy to sustainably reduce pesticides. Plant genetic resistance has long been used to create resistant varieties. Plant resistance inducers (PRI) are also considered to promote crop health, but their effectiveness is partial and can vary according to the environment and the plant genotype. We investigated the putative interaction between intrinsic (genetic) and PRI-induced resistance in apple when affected by scab and fire blight diseases. A large F1 mapping population was challenged by each disease after a pre-treatment with acibenzolar-S-methyl (ASM) and compared with the water control. Apple scab and fire blight resistance quantitative trait loci (QTLs) were detected in both conditions and compared. ASM exhibited a strong effectiveness in reducing both diseases. When combined, QTL-controlled and ASM-induced resistance acted complementarily to reduce the symptoms from 85% to 100% depending on the disease. In our conditions, resistance QTLs were only slightly or rarely affected by ASM treatment, despite their probable implication in various stages of the resistance build-up. Implications of these results are discussed considering already known results, the underlying mechanisms, cross-protection of both types of resistance against pathogen adaptation, and practical application in orchard conditions.

Keywords: Intrinsic resistance, induced defense, *Malus domestica*, *Venturia inaequalis*, *Erwinia amylovora*

b- Introduction

Plant diseases threaten global agricultural production, leading to the extensive use of pesticides. Plant genetic resistance is considered as a major lever, and breeding for new resistant varieties is very active in most crop species. However resistance genes exert selection pressures on pathogens, triggering their evolution (McDonald and Linde, 2002). Diversifying and pyramiding resistance genes, especially when controlling both qualitative and quantitative resistance, is considered as a promising approach for achieving durable resistance (Pilet-Nayel et al., 2017). Such diversification is indeed expected to promote conflicting selection pressures on pathogen populations, which should constrain them to an evolutionary compromise limiting their development.

Reduced reliance on conventional pesticides can be also achieved by biocontrol (Pal and McSpadden Gardener, 2006; Burketova et al., 2015). Plant resistance inducers (PRIs, also called elicitors or plant defense activators) are part of biocontrol methods. They include a range of chemical (Bektas and Eulgem, 2015) or biological (Wiesel et al., 2014) stimulators able to activate plant defenses, without direct toxicity against pathogens (Oostendorp et al., 2001; Oliveira et al., 2016). PRIs provide most often partial resistance only and their performance are greatly influenced by abiotic and biotic factors including the pathogen and the plant genotype (Walters et al., 2013). However, mechanisms underlying these numerous interactions are not clearly understood. Regarding the plant, comprehensive knowledge on genotype-PRI interactions could re-orientate plant breeding programs towards responsive genotypes or assist the choice of varieties to be deployed in practice, especially if PRIs are intended to be used in pest management programs. Combination of genetic resistance with PRIs are expected to multiply selection pressures on pathogen populations and thus limit their evolution, similarly to the combination of genetic resistance.

Apple (*Malus domestica*) is a major fruit tree species which requires a tremendous amount of pesticides in temperate climate conditions (MacHardy, 1996). Apple genotypes display a great variability of responses to apple scab, caused by the ascomycete fungus *Venturia inaequalis* and fire blight, caused by the bacterium *Erwinia amylovora*, two major diseases impacting orchards. Genetic mapping studies revealed numerous R genes and QTLs involved in resistance against apple scab (summarized in Khajuria et al., 2018) and fire blight (reviewed in Malnoy et al., 2012; Emeriewen et al., 2019), conferring partial to complete resistance to the

diseases. Some of these loci are known to be strain-specific, with breakdown of resistance already demonstrated (Parisi, 1993; Caffier et al., 2010, 2015; Wöhner et al., 2014; Peil et al., 2020; Patocchi et al., 2020). The *Rvi6* gene, also called *Vf* from *Malus floribunda*, was one of the genes most widely used in apple breeding programs but was overcome as early as 1981 by *V. inaequalis* race 6 (Parisi, 1993). In apple, as in most plant species, quantitative resistance is considered more durable than qualitative resistance due to the multiple loci controlling selection pressure on pathogen populations (Parlevliet, 2002; Pilet-Nayel et al., 2017). However a slow erosion of some QTLs has already been demonstrated (Caffier et al., 2014, 2016).

Acibenzolar-S-methyl (ASM), a functional salicylic acid analog, is one of the most promising PRIs on several plant species (Gozzo and Faoro, 2013). It promotes systemic acquired resistance (SAR) and consequently the induction of various defense responses including pathogenesis-related proteins, leading to the protection of many species against a broad spectrum of pathogens (Romero et al., 2001; Assis et al., 2015; Matsuo et al., 2019; Youssef et al., 2019; Ishiga et al., 2020). On apple, several studies reported significant control of apple scab (Bengtsson, Lyngs Jørgensen, et al., 2006; Bengtsson et al., 2009; Marolleau et al., 2017) and fire blight (Brisset et al., 2000; Maxson-Stein et al., 2002; Hassan and Buchenauer, 2007; Abo-Elyousr et al., 2010; Shahini Sough et al., 2010; Dugé de Bernonville et al., 2014; Aćimović et al., 2015; Johnson et al., 2016; Marolleau et al., 2017), as well as the triggering of molecular defense response (Brisset et al., 2000; Ziadi et al., 2001; Maxson-Stein et al., 2002; Dugé de Bernonville et al., 2014; Warneys et al., 2018). Although significant, performance of ASM exhibits variability that remains to be understood for its practical use in the orchard. Among others, the genetic factor is still poorly investigated.

In this paper, we explored the added value of combining intrinsic (genetic) resistance against apple scab and fire blight with induced resistance conferred by ASM using a genetic mapping approach. QTLs composition in a segregating population was compared between ASM-treated and -untreated plants in order to highlight genetic determinants which could explain or interact with ASM performance.

c- Materials and Methods

Plant material. All experiments were performed with a F1 population referred as the 'TxF progeny' and previously described in Laloi et al. (2016). The 267 individuals were derived from a controlled cross between TN10-8 and Fiesta, two genotypes partially resistant to apple scab. Fiesta is also partially resistant to fire blight. For each experiment, up to ten replicates per individual were grafted and grown in greenhouse under semi-controlled growing conditions (23°C day/20°C night, humidity 40-80% and artificial light to complement natural light). Graftwood was collected from a conservatory orchard located at INRAE (Angers, France) and grafted on MM106 apple rootstock. The two parents and two susceptible control cultivars (Golden Delicious and Gala) were also included in each experiment in 10 replicates.

Experimental design, treatment application and phenotypic data collection. For each experiment, out of the ten, four replicates with active growing shoots per individual and treatment condition were chosen and distributed in each treatment group in randomized blocks in the greenhouse. Two days before inoculation, plants were sprayed with a solution of BION® 50 WG (50% ASM; Syngenta, Basel, Switzerland) (called ASM treatment) or with reverse osmosis water as control (called the water control). A water dilution of 0.2 g.L⁻¹ for *V. inaequalis*-inoculated plants and 0.4 g.L⁻¹ for *E. amylovora*-inoculated ones was applied. The commercial advice (0.4 g.L⁻¹) was reduced for scab to maintain enough phenotypic variability across TxF progeny.

Two *V. inaequalis* isolates were used: the reference isolate EU-B04 (Origin : Belgium, host : Golden Delicious) previously described in Caffier et al. (2015) and Le Cam et al. (2019) and the isolate 09BCZ014 (Origin : France, host : TN10-8 x Prima progeny (individual E063), referred to as isolate 2557 in Laloi et al. (2017)). Monoconidial suspensions were prepared from diseased dry leaves at a concentration of 2.5 x 10⁵ conidia.mL⁻¹ and, sprayed on grafted trees, incubated thereafter two days at 17°C under plastic sheet to maintain a high humidity, according to the conditions described by Caffier et al. (2010). The percentage of leaf surface exhibiting sporulating lesions was scored at 14, 21 and 28 days post-inoculation using the ordinal scale (0-7) described in Calenge et al. (2004). Two experiments were performed with isolate EU-B04 (coded Vi-B04_1 et Vi-B04_2) and one with 09BCZ014 (coded Vi-Z14).

The reference strain CFPB1430 of *E. amylovora* from the French collection of phytopathogenic bacteria (Paulin and Samson, 1973) was used for inoculation. The bacterial suspension was prepared as described in Dugé de Bernonville et al. (2014) at 10^8 colony-forming units (CFU).mL⁻¹. Growing shoots (>10cm) were inoculated by cutting the two youngest unrolled leaves with scissors previously soaked in the bacterial suspension. The length of necrosis developing on stem was measured at 7, 14 and 21 days post-inoculation. The ratio between necrosis length and total shoot length was used as a severity score. Two experiments were performed (coded Ea-1430_1 and Ea-1430_2).

Data analysis of phenotypic data. Phenotypic data were analyzed separately for ASM treatment or the water control. The area under the disease-progress curve (AUDPC) was calculated as a quantitative summary of disease severity over time:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=0}^2 \frac{y_i + y_{i+1}}{2} x(t_{i+1} - t_i)$$

where y_i is the disease score at the i^{th} day of observation and t_i the number of day post-inoculation at the i^{th} observation.

All statistical analyses were performed using R software (Dalgaard, 2010). AUDPC were fitted for environmental trend effects using SpATS package (Rodríguez-Álvarez et al., 2018) which estimates a Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) for each individual. Broad-sense heritability of each trait for each treatment was also estimated with the function 'getHeritability' of the same package.

Genotyping data and genetic maps construction. DNA was extracted from fresh young leaf samples using oKtopure™ LGC Genomics robot and quantified with Hoechst protocol. The TxF progeny was genotyped with the Illumina Infinium 20K SNPs array (Bianco et al., 2014). Genotyping data were analyzed using GenomeStudio® Genotyping Module (V2.0, Illumina Inc., San Diego, California, USA) software with manual correction whenever necessary to improve dataset quality. Markers were filtered according to their parental segregation profile (ABxAA for the female map and AAxAB for the male map; markers in ABxAB were not considered). Then a linkage map was constructed for each parent with JoinMap 4.1 software using the Kosambi mapping function (Van Ooijen, 2006). Map quality was checked by comparison with the apple reference genetic map of Di Pierro et al. (2016) and an updated

version of the map (Howard et al., submitted). The software BiomercatorV4.2 (Arcade et al., 2004) was used to curate manually erroneous marker positions. Seventeen microsatellite (SSR) markers located in genomic regions where scab resistance QTLs were expected according to previous publications were added after genotyping of the TxF progeny (Supplementary Table S1).

QTL mapping. In order to compare the contribution of QTLs in resistance and in the interaction between genotypes and ASM, a mapping of QTLs was performed independently in water-control and ASM-treated populations. QTL analyses were conducted using the R/qtl package (Broman et al., 2003). Simple interval mapping (SIM) and composite interval mapping (CIM) were estimated using multiple imputation method and normal distribution model. Cofactors for CIM were determined from the best prediction model simulated with 'stepwise' function. LOD score threshold were determined using 1000 permutations to identify the statistically significant QTLs ($\alpha = 0.05$ genome-wide). LOD thresholds were about 5 for both scab and fire blight experiments. Suggestive QTLs with LOD score between 3 and 5 were also considered. LOD score, 2-LOD support confidence interval (CI) and contribution of each QTL to the overall phenotypic variance (individual R^2) were extracted from R/qtl analyses, together with the global QTL contribution (global R^2). Individual and global R^2 were calculated with the 'fitqtl' (for fitting a defined multiple-QTL model) function. Interactions between QTLs were studied by variance analysis using the genotyping data of each SNP closest to the peak of each QTL and were detailed by the 'effectplot' function. These results were used to define the model for the calculation of the global R^2 with 'fitqtl'. To adequately compare QTL effects between treatments by taking into account the overall phenotypic variation in each treatment, relative QTL effect (rEffect) were calculated for each QTL as follows: $rEffect = \frac{1}{\sigma_B} \times \frac{|BLUP(AA) - BLUP(AB)|}{2}$, where AA and AB are the allelic versions at the SNP closest to the QTL peak and σ_B is the standard deviation of BLUP (adjusted for all other significative QTLs effects than the QTL considered) for a given treatment condition. The confidence intervals at 5% of rEffects were simulated by bootstrapping with 5000 replicates using 'boot' function: when comparing rEffects of a given QTL between the water control and ASM treatment, the overlap of the confidence intervals was interpreted as if the effects were not significantly different. For simplicity, QTL alleles were then considered equivalent to SNP alleles at QTL peaks.

Besides, a QTL detected at almost the same genomic position in various experiments were considered and named as the same QTL.

In Vi-B04 experiments, a clear bimodal distribution was observed (see results below). This distribution fitted with the strong effect of the major QTL (simply called qT1 here) detected on LG1 of TN10-8 after inoculation with this isolate (Calenge et al., 2004) or with a mixture of isolates including EU-B04 (Lê Van et al., 2012). For that reason, the TxF progeny was subdivided into two subsets of individuals according to the presence/absence of the resistance allele at qT1 predicted by SNP data at the QTL peak. QTL analyses were then conducted on both sub-populations (further called qT1+ and qT1- sub-populations). Conversely, isolate 09BCZ014 was shown to partially overcome the QTL qT1 by Laloï et al. (2017; isolate '2557'). QTL analysis was thus performed on the whole TxF progeny with the latter isolate.

d- Results

Phenotypic variability. Only experiments involving the most replicates per individual, Vi-B04_1, Vi-Z14 and Ea-1430_1 are presented here (the two additional experiments Vi-B04_2 and Ea-1430_2 are available as supplementary data).

A significant reduction of AUDPC was observed for both scab and fire blight after ASM treatment compared to the water control (Table 1). For the TxF progeny, AUDPC was reduced by 54% for Vi-B04_1, 73% for Vi-Z14 and 50% for Ea-1430_1. Similar reductions were observed for the two parents and susceptible controls (Figure 1). A large variation was observed among individuals regardless of the conditions, with AUDPC values ranging from 0 to 150 for Vi-B04_1, from 0 to 75 for Vi-Z14 and from 1 to 11 for Ea-1430_1 (Figure 1). A higher coefficient of variation was observed for scab (CV=0.75 – 1.27) than for fire blight (CV=0.27 – 0.34; Table 1). The distributions were generally unimodal except for the water control in Vi-B04_1 where a clear bimodal distribution was observed (Figure 1A), fitting with the expected effect of QTL qT1 (see Materials and Methods). Broad-sense heritabilities (h^2) were generally high whatever the conditions, ranging from 0.63 for fire blight after ASM treatment to 0.94 for scab after the water control (Table 1). Adjusting the data for spatial effects resulted in a limited increase of heritability from 0.01 to 0.08 units compared to no adjustment (data not shown). Correlation

coefficients (Cor) between the water control and ASM treatment were intermediate to high (0.6 – 0.9) according to the experiments (Figure 1). The range of AUDPC values observed in ASM-treated individuals increased as AUDPC values of the corresponding water-treated individuals increased, suggesting interactions between genotypes and treatments especially for the less resistant individuals (Figure 1). AUDPC mean values were lower in Vi-B04_2 and Ea-1430_2 experiments but the variation of AUDPC was similar (Supplementary Table S2 and Supplementary Figure S1). The correlation coefficients between both Vi-B04 experiments were 0.74 for the water control and 0.73 for ASM-treatment, while they were only 0.19 and 0.16 between both Ea_1430 experiments, respectively.

QTL detection for *V. inaequalis* isolate 'EU-B04'. A total of 6245 SNPs was found polymorphic in the TxF progeny and one or both parents. After discarding 4433 SNPs polymorphic in both parents and redundant, two parental genetic maps of 17 linkage groups were constructed with 853 and 959 SNPs for TN10-8 and Fiesta, respectively. Both parental maps were merged in a single file for further detections of QTLs (Supplementary Table S3).

For the water control condition, a major QTL effect (LOD \sim 77; $R^2 = 69.9\%$) was detected on LG1 together with three other significant QTLs on LG T13, F11 and F17 and one suggestive on LG F12 when considering the whole TxF progeny (Supplementary Table S4, Figure 2). The presence of the former QTL (corresponding to qT1) was consistent with the bimodal distribution observed above. In the qT1- sub-population, four significant QTLs and one suggestive QTL were detected on linkage groups T13, F3, F11, F17 and F12, respectively (Table 2, Figure 2). They explained from 3.7 to 29.0 % of phenotypic variation and their relative effect (rEffect) varied from 0.32 (QTL qF12) to 0.66 (QTL qF17), compared to 0.85 for QTL qT1 in the whole TxF progeny (Figure 2). A significant interaction was found between QTLs qF11 and qF17 (Table 3). No AUDPC difference was detectable between both alleles of qF11 when the 'unfavorable' (i.e., susceptible) allele of qF17 (AA) was present (genotypic classes AA:AA and AB:AA with high AUDPC values at 149.6 and 146.2, respectively). With the 'favorable' (i.e., resistant) allele of qF17, the 'favorable' allele of qF11 was on the contrary very efficient with AUDPC values decreasing from 131.3 to 99.5 for the combination of QTL alleles AA:AB, indicating a complementary relationship between 'favorable' alleles of both QTLs. Altogether, QTLs on LG T1, T13, F11, F12 and F17 explained 81.9% of phenotypic variation in the whole progeny, whereas the five QTLs including the QTL interaction explained 65.1% of phenotypic

variation in the qT1- sub-population (Table 1). For ASM-treatment condition, QTL qT1 still exhibited a strong effect (LOD \sim 46; $R^2 = 60\%$) in the whole TxF progeny (Supplementary Table S4, Figure 2) together with QTLs qF17 and qF11 as a suggestive QTL (Supplementary Table S4). All three explained 70.2% of the phenotypic variation. In the qT1- sub-population, only three out of the five QTLs detected in the water-control condition were detected (Table 2). QTLs qT13 and qF3 completely disappeared after ASM treatment with a LOD score lower than 0.2 at the SNP near to the peak of the same QTL detected in the water control and a non-significant effect for qF3 (Figure 2). The three other QTLs were detected at roughly the same positions on linkage groups as with the water control and the significant interaction between qF11 and qF17 was also found with the same pattern as above (Table 3). Their relative effects were not significantly different from the water control and were thus not significantly modulated by ASM treatment, despite much stronger LOD score and R^2 for qF17 (21.2 and 39.9% with ASM treatment compared to 12.4 and 29.0% with the water control) and lower LOD score and R^2 for qF11 (7.6 and 10.7% compared to 10.7 and 18.1%, respectively) (Table 2, Figure 2).

For experiment Vi-B04_2, the same QTLs were detected despite at lower LOD scores than in the first experimentation (Supplementary Table S5). In the whole TxF progeny, qT1 was still detected as the strongest QTL for both treatment conditions (LOD \sim 35; $R^2 \sim 40-48\%$) together with qF11 and qF12 as suggestive QTL (water control) and qF17 (both conditions) and still a significant interaction between qF11 and qF17 (Supplementary Table S6, water control). In the qT1- sub-population, qF17 was the single significant QTL detected, while qT13, qF3, qF11 and qF12 were detected as suggestive QTLs with mostly similar R^2 compared to the Vi-B04_1 experiment. Three significant interactions between QTLs were detected, two of them involving qT13 with qF11 and qF17 respectively (Supplementary Table S6). In this experiment, ASM treatment did not significantly modulate the QTL effect on any of the QTLs detected (Supplementary Figure S2).

QTL detection for *V. inaequalis* isolate '09BCZ14'. For the water control condition, all the QTLs detected in Vi-B04_1 were also detected in Vi-Z14, except on LG F12, and a new suggestive QTL was detected on LG T10. The phenotypic variation explained by these QTLs ranged from 3.5 to 10.7% and the relative effects from 0.25 (QTL qT10) to 0.42 (QTLs qT13 and qF17) (Table 2, Figure 2). Interaction between QTLs qF11 and qF17 was still significant

whereas new interactions were found significant between qT1 and qF3, between qT13 and qF3 and between qT10 and qF11 (Table 3). Altogether, these QTLs and interactions explained 47.5% of the phenotypic variation (Table 1). For ASM-treatment condition, three out of the six QTLs identified in the water control were still detected but only as suggestive QTLs (qT13, qF11, qF17; Table 2). Altogether, they explained only 15.0% of the phenotypic variation without any interactions. The relative effects of these QTLs were not significantly different when compared with the water control (Figure 2). Conversely, the relative effect of qT1 was significantly lower for ASM treatment than for the water control (Figure 2).

QTL mapping for fire blight resistance. For the water control condition, four QTLs (two significant and two suggestive) were detected on LG T3, T5, F7 and F15 explaining from 3.1 to 20.1% of total phenotypic variation (Table 2, Figure 3). Altogether, these QTLs explained 35.0 % of the phenotypic variation. The same QTLs except LG F15 were found for ASM-treatment condition, together with a new significant QTL on LG F5 (Table 2). These QTLs explained from 4.6 to 13.2% of the phenotypic variation (33.1% altogether). On LG T5, the peak of the QTLs was offset by ~20cM between the water control and ASM treatment, which suggests two different QTLs. The relative effects of these QTLs were not significantly different when compared with the water control (Figure 3). No significant interaction could be identified between the QTLs in both conditions.

In the Ea-1430_2 experiment for water-control condition, three QTLs previously identified were maintained (qT3, qT5, qF15), two new QTLs were detected (qT15, qF5) and one was no longer detected (qF7) (Supplementary Table S5). Surprisingly, qF7 was the QTL with the strongest effect in the first experiment; only a weak peak was detected here with a LOD of 1.8. For ASM treatment condition, three new QTLs qT1, qT7 and qF1 were identified while three others disappeared (qT3, qT15, qF15). The QTL interactions in the two conditions are totally different (Supplementary Table S6). Among the nine QTLs identified, qT3 and qF15 relative effect were significantly modulated by ASM (Supplementary Figure S3).

Tables

Table 1. Mean values (\pm standard-deviation) of AUDPC, relative effectiveness of ASM, coefficient of variation of individual BLUPs (CV), broad-sense heritability (h^2) and phenotypic variation explained by all detected resistance QTLs (global R^2) against scab (*V. inaequalis* isolates EU-B04 and 09BCZ14; experiments Vi-B04_1 and Vi-Z14, respectively) and fire blight (*E. amylovora* isolate CFPB1430; experiment Ea-1430_1) in the TxF progeny. Values for the sub-population qT1- are indicated within brackets. Effectiveness of ASM is computed as: (Mean-water – Mean-PRI)/Mean-water.

Experiment	Treatment	Mean	Effectiveness ASM (%)	CV	h^2	Global R^2
Vi-B04_1	water	41.2 \pm 36.8		0.84 [0.29] _{qT1-}	0.94	81.9 [65.1] _{qT1-}
	ASM	18.9 \pm 26.4	54	1.27 [0.48] _{qT1-}	0.91	70.2 [53.8] _{qT1-}
Vi-Z14	water	24.1 \pm 21.4		0.75	0.84	47.5
	ASM	6.6 \pm 8.4	73	0.88	0.71	15.0
Ea-1430_1	water	6.2 \pm 2.4		0.27	0.70	35.0
	ASM	3.1 \pm 1.8	50	0.34	0.63	33.1

Table 2. Parameters associated with the quantitative trait loci (QTLs) identified for disease resistance against scab (experiments Vi-B04_1, sub-population qT1-, and Vi-Z14) and fire blight (experiment Ea-1430_1) in the TxF progeny after water- or ASM-treatment.

Trait	Treatment	Linkage group	Position	LOD ^a	R ²	CI ^b
Vi-B04_1 _{qT1-}	water	T13	3.58	8.6	9.3	0.00 – 6.80
		F3	13.36	5.7	5.5	8.25 – 18.54
		F11	5.00	10.7	18.1	0.00 – 20.98
		<i>F12</i>	<i>25.99</i>	<i>3.0</i>	<i>3.7</i>	<i>20.46 – 31.56</i>
		F17	18.92	12.4	29.0	16.52 – 27.35
	ASM	<i>T13</i>	<i>3.58</i>	<i>0.3</i>	-	-
		<i>F3</i>	<i>44.80</i>	<i>0.8</i>	-	-
		F11	0.00	7.6	10.7	0.00 – 7.91
		<i>F12</i>	<i>19.28</i>	<i>4.0</i>	<i>5.1</i>	<i>10.83 – 24.43</i>
		F17	18.00	21.2	39.9	16.52 – 20.90
Vi-Z14	water	T1	45.03	9.4	10.7	39.01 – 52.89
		<i>T10</i>	<i>62.09</i>	<i>3.6</i>	<i>3.5</i>	<i>54.88 – 65.69</i>
		T13	3.18	10.9	10.1	0.00 – 6.80
		F3	3.92	5.1	5.3	0.00 – 9.03
		F11	5.53	7.8	7.9	0.00 – 20.98
	ASM	F17	18.92	9.1	10.7	14.18 – 27.35
		<i>T1</i>	<i>36.61</i>	<i>1.7</i>	-	-
		<i>T10</i>	<i>62.09</i>	<i>2.2</i>	-	-
		<i>T13</i>	<i>0.00</i>	<i>4.1</i>	<i>6.3</i>	<i>0.00 – 6.80</i>
		<i>F3</i>	<i>5.50</i>	<i>1.1</i>	-	-
		<i>F11</i>	<i>3.17</i>	<i>3.9</i>	<i>5.0</i>	<i>0.00 – 8.69</i>
		<i>F17</i>	<i>18.92</i>	<i>4.2</i>	<i>5.0</i>	<i>13.79 – 27.35</i>
Ea-1430_1	water	<i>T3</i>	<i>23.57</i>	<i>4.1</i>	<i>3.1</i>	<i>11.81 – 26.76</i>
		T5	54.33	5.8	5.2	43.24 – 62.05
		<i>F5</i>	<i>39.73</i>	<i>2.5</i>	-	-
		F7	69.46	18.4	20.1	67.10 – 71.42
		<i>F15</i>	<i>76.05</i>	<i>3.7</i>	<i>3.9</i>	<i>70.94 – 81.15</i>
	ASM	<i>T3</i>	<i>20.38</i>	<i>3.7</i>	<i>4.6</i>	<i>17.13 – 29.18</i>
		T5	35.22	4.9	4.6	28.37 – 40.84
		F5	38.56	6.3	8.4	32.18 – 42.08
		F7	69.07	12.2	13.2	67.10 – 71.42
		<i>F15</i>	<i>86.70</i>	<i>2.9</i>	-	-

^a LOD thresholds were obtained after permutations (n=1000): 5.1 (Vi-B04_{qT1-}_water), 4.6 (Vi-B04_{qT1-}_ASM), 5.0 (Vi-Z14_water and Vi-Z14_ASM), 4.7 (Ea-1430_water) and 4.6 (Ea-1430_ASM). Significant QTLs are shown in bold. Suggestive QTLs with LOD score between 3.0 and the LOD threshold are shown in italics. QTLs being insignificant in a condition but significant in another are shown in grey. ^b position of 2-LOD support QTL confidence interval borders.

Table 3. Interactions between significant and suggestive QTLs identified in Vi-B04_1qT1- and Vi-Z14 experiments.

Trait	QTLs combination	water					ASM				
		AA:AA	AB:AA	AA:AB	AB:AB	F-value ^a	AA:AA	AB:AA	AA:AB	AB:AB	F-value ^a
Vi-B04_1qT1-	qF11:qF17	149.6	146.2	99.5	131.3	12.1 ***	94.7	93.2	49.0	70.0	8.9 **
Vi-Z14	qT1:qF3	34.2	19.2	24.7	16.6	6.6 *	-	-	-	-	-
	qT13:qF3	19.9	35.5	15.8	25.4	6.6 *	-	-	-	-	-
	qT10:qF11	15.7	24.3	23.1	31.2	4.9 *	-	-	-	-	-
	qF11:qF17	31.3	32.3	12.8	24.9	4.2 *	-	-	-	-	-

^a F-value of the variance analysis Fisher-test where stars represent the significance of the test at the risk of 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.005 (***).

Figures

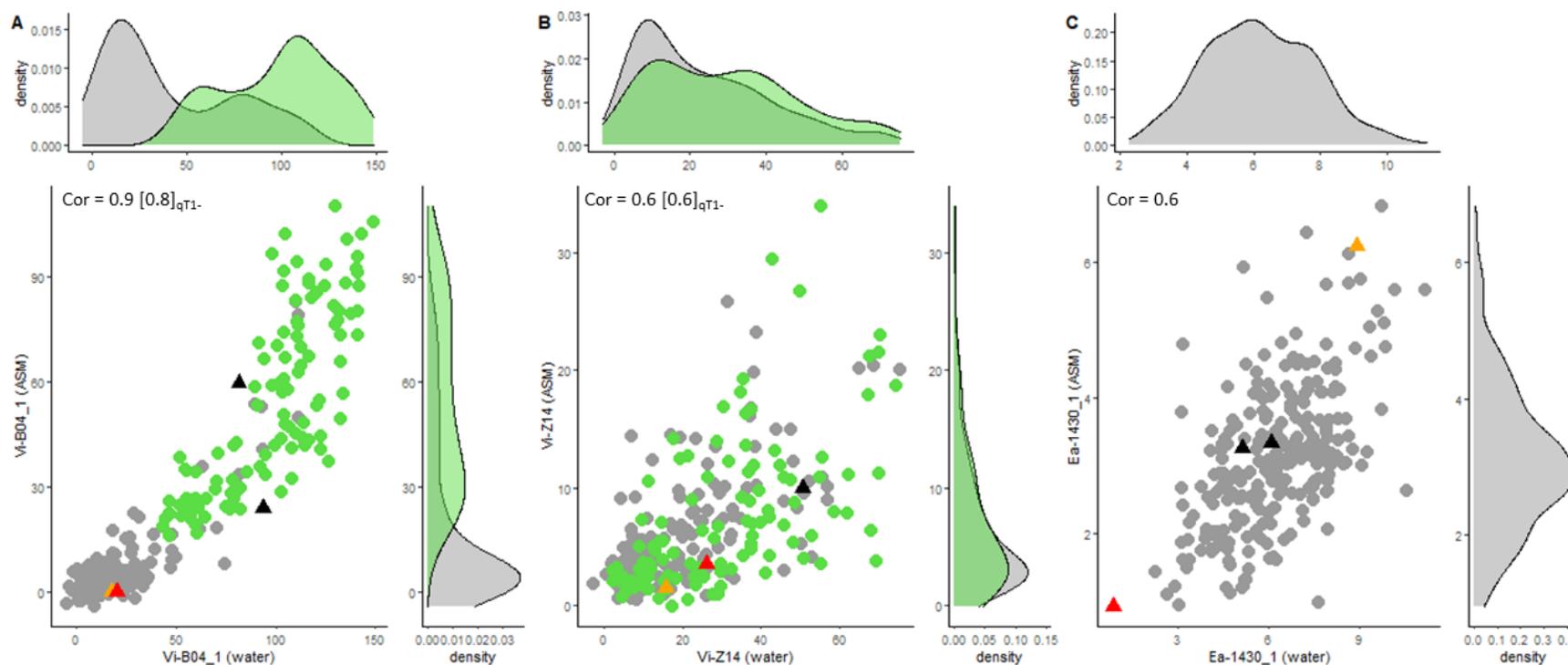


Figure 1. Relationship between disease severity (BLUP estimates) for water- and ASM-treated individuals of the TxF progeny in (A) Vi-B04_1, (B) Vi-Z14 and (C) Ea-1430 experiments. Distributions of BLUPs are shown in the upper (water control) and right (ASM treatment) part of each graph where the complete population is represented in grey and the sub-population qT1- (i.e., individuals selected as not-carrying the resistance allele of the major QTL qT1) in green. The same color code is used in the graph where the green dots are superimposed on the grey dots. Control and parental genotypes are shown with triangles in orange (TN10-8), red (Fiesta) and black (Gala and Golden Delicious). Cor is the Pearson coefficient of correlation between water and ASM BLUPs. Values for the sub-population qT1- are indicated within brackets.

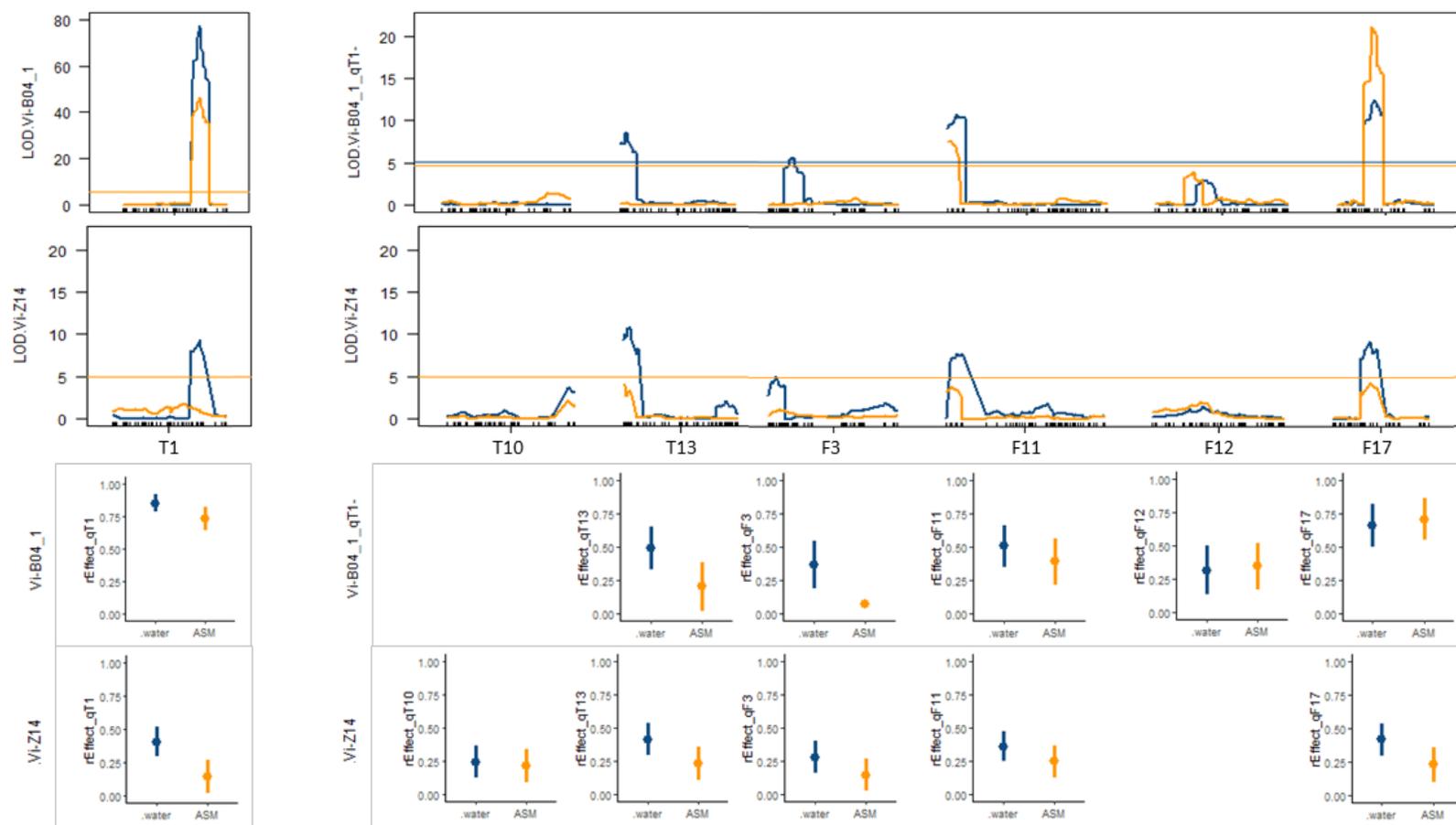


Figure 2. LOD score curves of QTLs involved in resistance against scab (Vi-B04_1 and Vi-Z14) for each treatment identified in the TxF progeny (upper part) and relative effects (rEffects) of these QTLs (lower part). Blue and orange colors represent respectively the water control and ASM treatment. LOD score thresholds are drawn as horizontal lines with the respective colors. In each rEffect plot, mean and standard deviation of each rEffect, calculated with bootstrapping, are represented by a point and a vertical bar respectively, with the respective blue and orange color for water-control and ASM-treatment respectively.

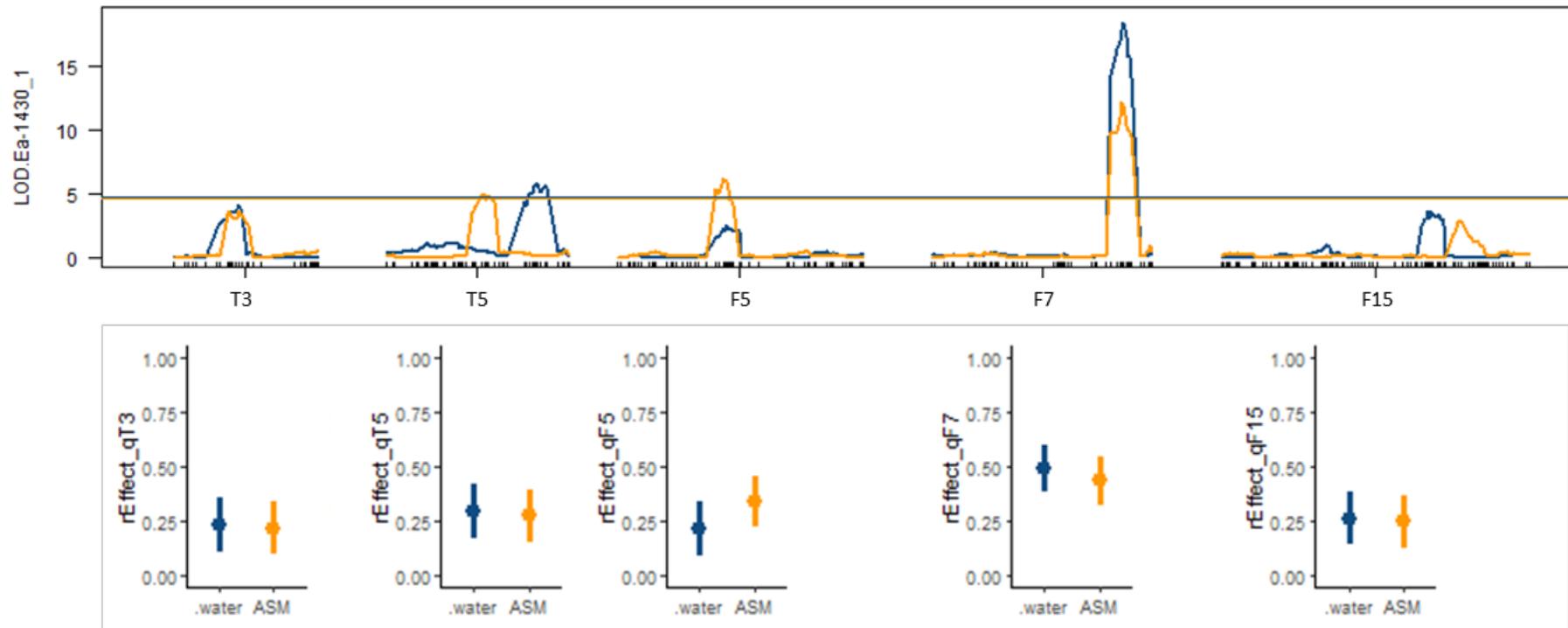


Figure 3. LOD score curves of QTLs involved in resistance against fire blight (Ea-1430_1) for each treatment identified in the TxF progeny (upper part) and relative effects (rEffects) of these QTLs (lower part). Blue and orange colors represent respectively the water control and ASM treatment. LOD score thresholds are drawn as horizontal lines with the respective colors. In each rEffect plot, mean and standard deviation of each rEffect, calculated with bootstrapping, are represented by a point and a vertical bar respectively, with the respective blue and orange color for water-control and ASM-treatment respectively.

e- Discussion

A first result of our study has been to confirm already known scab and fire blight resistance QTLs and to detect new ones under the water control condition. For scab resistance, QTLs located on LG1 of TN10-8 (qT1) and on LG11 and LG17 of Fiesta (qF11 and qF17, respectively) were previously detected and confirmed in various studies (Durel et al., 2003; Liebhard et al., 2003; Calenge et al., 2004; Soufflet-Freslon et al., 2008; Lê Van et al., 2012). The added value of the present study is the refinement of their genetic position with reduced confidence intervals compared to previous studies. As stated above, qT1 is precisely colocalized with the *Rvi6* (*Vf*) gene at position 43.03 cM of the genetic map corresponding to the CH-Vf1 SSR marker, tightly associated to that R-gene (Vinatzer et al., 2004). qT1 is thus a potential allele or paralog of *Rvi6* and can thus be postulated as an extracellular leucine-rich repeat receptor-like gene (Belfanti et al., 2004; Calenge et al., 2004). Another key aspect is the confirmation of the strong complementary (synergistic) interaction between qF11 and qF17 as already highlighted by Caffier et al. (2014). Such an interaction can be interpreted as the complementary action of two genes successively involved in a metabolic pathway (McMullen et al., 1998). The dependency of the qF11 allelic contrast upon the unfavorable or favorable allele of qF17 could be tentatively interpreted as an upstream position of the gene underlying qF17 and a downstream position of the gene underlying qF11. Thus, qF11 and qF17 could rather be involved in a signaling or defense pathway, unlike qT1 more probably involved in pathogen effector or PAMP recognition. Although reduced, the confidence intervals of these QTLs were still too wide to search for sufficiently plausible candidate genes. An attempt was made for qF17 and yielded over 160 positional candidates (data not shown). New scab resistance QTLs were detected on LGs 10 and 13 of TN10-8 and LGs 3 and 12 of Fiesta. The most significant were qT13 and qF3 detected at genomic positions not yet identified in other scab resistance studies. They will therefore be considered as a priority for further marker-assisted breeding.

For fire blight resistance, the QTL qF7 was consistently detected on LG7 of Fiesta in the first experiment as already published (Calenge et al., 2005; Khan et al., 2007). The refinement of its genetic position was allowed with reduced confidence intervals compared to previous studies. This QTL was shown to interact with two other ones on LG8 and LG13 (van de Weg et al., 2018), but these genomic regions were not detected in our study. Implication in a

metabolic pathway could nevertheless be postulated for qF7 due to such interactions. We also identified resistance QTLs on LGs 3, 5 and 15 which may coincide with those published by Calenge et al. (2005), Durel et al. (2009) and Le Roux et al. (2010) respectively, despite their genomic position was not very accurate. In our second experiment, qF7 was no more detected which calls into question the relevance of this experiment, especially in view of the low AUDPC and heritability values obtained and the weak correlation between both Ea-1430 experiments. This second experiment was performed very early in the season (early February) at an unusual time for fire blight experiment which could explain this surprising result.

In the present study, we propose for the first time a QTL mapping approach to search for genetic factors influenced by a PRI. A few studies highlighted the influence of genotypes on the effectiveness of PRIs but without any link with intrinsic genetic resistance of varieties (Vallad and Goodman, 2004; Sharma et al., 2010; Maisonneuve et al., 2013). Pawlowski et al. (2016) underlined the specific interaction between the genetic and PRI-induced resistance but did not characterize the genetic resistance factors. A mapping approach has the advantage of exploring in detail the putative modulation of genetic resistance factors by PRIs. In our study, the results show that genetic resistance controlled by QTLs is only slightly or rarely affected by ASM treatment. Out of the seven scab resistance QTLs detected, only two QTLs (qF3 for Vi-B04_1, and qT1 for Vi-Z14) almost disappeared after treatment with ASM. We also detected two fire blight resistance QTLs (qT3, qF15) which effects significantly decreased after ASM treatment in the second Ea-1430 experiment, but the experimental conditions were questionable. Despite a large mapping population, the confidence intervals surrounding relative effects of QTLs were large and therefore precluded the detection of low modulation of QTL effects by ASM. More individuals and replicates per individual would have been necessary to detect such modulations. Furthermore, no QTL specific to the ASM treatment condition was detected: all QTLs detected with ASM were already identified as resistance QTLs under the water control. The general trend was either a maintenance or a reduction in the relative effect of QTLs. Some of them fully disappeared (significantly) but this observation was hard to repeat for both diseases. To some extent, this QTL effect disappearance could also be explained by a scale effect. Indeed, the application of ASM strongly reduces the global variability in disease severity and the weakest QTLs under the water control can become insignificant under ASM treatment due to a consequent lack of statistical power. However, a

general trend of maintenance or small reduction of most QTLs is surprising: considering the overall effectiveness of ASM on reducing disease symptoms and the interactions observed between less resistant genotypes and treatment, it would have been expected to find more interactions between pathways leading to this resistance.

To go further, according to the diverse nature of the QTLs present in our population, we expected to observe some QTLs responding to ASM and others remaining unchanged. ASM is known to act on salicylic acid signaling pathway. In tobacco, it is perceived by the SABP2 protein (Salicylic acid-binding protein 2) which transforms it into acibenzolar which then interacts with NPR1 to activate the transcription of a set of genes in the SAR pathway (Tripathi et al., 2010; Warneys et al., 2018; De Jong et al., 2019; Ishiga et al., 2020; Li et al., 2020). If we consider the three stages of resistance build-up, namely recognition, signaling and defense, we could postulate that QTLs involved in signaling and defense could be more affected by ASM than QTLs involved in effectors or PAMPs recognition. However, the qT1 previously described as most probably involved in pathogen recognition disappeared with 09BCZ014 isolate but not with EU-B04, whereas the QTLs qF11, qF17 and qF7, potentially rather involved in signaling or defense pathways were not significantly affected by ASM. Various hypotheses can be formulated for interpreting our results. In Arabidopsis, Tsuda et al. (2009) showed that each of the salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) signaling sectors can positively contribute to immunity against both biotrophic and necrotrophic pathogens. The authors schematized various situations of compensation or synergy between different sectors of a complex signaling network where the effector or PAMP recognition (input) can generate equivalent restriction of pathogen growth (output) while mobilizing very different sectors interacting or not. In our situation, ASM treatment would reinforce one of the signaling sectors with possible consequences on other sectors given SA *versus* JA/ET compensation, while resistance QTLs positioned at various locations of the network would impact the flow along some of these pathways. Some of the detected QTLs could therefore be located on metabolic pathways independent of the SA pathway while others could be implied in the SA pathway and thus be affected by the strong initial supply of ASM. In-depth exploration of the metabolic mechanisms involved in genotypes carrying or not resistance QTL alleles, with or without ASM treatment, is needed to precise the interactions between pathways.

Our study revealed that the intrinsic resistance controlled by QTLs and the resistance induced by ASM have a complementary effect for the control of apple scab and fire blight. In our study, the average effectiveness of ASM in reducing the disease ranged from 50% for Ea-1430_1 to 78% for V1-B04_2. Under the water control, the individuals cumulating favorable alleles at all detected QTLs exhibited a disease reduction of 91% for Vi-B04_1 and 98% for Vi-Z14 compared to individuals carrying only unfavorable QTL alleles for scab, and 78% for fire blight. When intrinsic and ASM-induced resistance was combined, the disease reduction was close to 100% for scab and 85% for fire blight. These results confirm that there is no incompatibility between intrinsic and ASM-induced resistance for apple as reported for cucumber (da Rocha and Hammerschmidt, 2005). The present results were obtained under controlled conditions but arguments suggest that the same trends could be observed in orchards. On the one hand, Caffier et al. (2014, 2016) showed that quantitative resistance related to QTLs qT1, qF11 and qF17 significantly reduced scab severity in orchards. On the other hand, Marolleau et al. (2017) confirmed that ASM could be integrated into orchard protection practices to control apple scab. Combining both types of resistance in the orchard should allow a better control of apple scab and similarly for fire blight.

In addition to improve protection effectiveness, the interest in combining intrinsic and PRI-induced resistance could rely in a cross-protection of both types of resistance through a diversification of selection pressures on pathogen populations which would reduce or slow down their adaptation (Lê Van et al., 2013; Caffier et al., 2014). The use of ASM in combination with genotypes cumulating several QTLs involved in different defense pathways could be a promising sustainable protection for the control of apple scab and fire blight. A thorough analysis of the mechanisms activated by this resistance will confirm these hypotheses and all of these results must be confirmed in the orchards for possible integration into the protection practices.

f- Acknowledgements

The authors greatly thank the PHENOTIC platform, especially M. Boucourt, C. Cattané, C. Colas and R. Gardet, for carefully taking care of the plant material in the greenhouse. They thank the Horticole Experimental Unit (UE Horti) for maintaining the trees over many years in a conservatory orchard belonging to the BRC RosePom. X. Cazenave, E. Chevreau, R. Cournot, A. Degrave, C. Denancé, N. Dousset, C. Heintz, A. Juillard, L. Lejus, J. Malabarba, K. Menacer,

H. Muranty, A. Petiteau, C. Pubert, P. Robert, E. Vergne helped in preparing the experiments and in scoring apple scab and fire blight disease in the greenhouse: they are all warmly thanked. The genetic map was carefully checked thanks to an updated version of the reference genetic map kindly furnished by N. Howard. They thank E. Millet, D. Lopez-Arias and S. Adamowicz for sharing R scripts for analysis of field trial experiments, QTLs detection and bootstrapping, respectively.

g- Literature Cited

Abo-Elyousr, A.M.K., Sallam, M.A.A., Hassan, M.H.A. and Zeller, W. 2010. Effect of Acibenzolar-S-methyl and *Rhynchospora aquatilis* (Ra39) on chitinase and β -1,3-glucanase activities and disease resistance of apple plants. *Plant Pathol. J.* 26: 63–69.

Aćimović, S.G., Zeng, Q., McGhee, G.C., Sundin, G.W. and Wise, J.C. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–10.

Arcade, A., Labourdette, A., Falque, M., Mangin, B., Chardon, F., Charcosset, A. and Joets, J. 2004. BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20: 2324–2326.

Assis, F.A., Moraes, J.C., Assis, G.A. and Parolin, F.J.T. 2015. Induction of caterpillar resistance in sunflower using silicon and acibenzolar-S-methyl. *J. Agr. Sci. Tech.* 17: 543–550.

Bektas, Y. and Eulgem, T. 2015. Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–9.

Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., Vinatzer, B.A., Gianfranceschi, L., Gessler, C. and Sansavini, S. 2004. The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 886–890.

Bengtsson, M., Lyngs Jørgensen, H.J., Pham, A., Wulff, E. and Hockenhull, J. 2006. Screening of organically based fungicides for apple scab (*Venturia inaequalis*) control and a histopathological study of the mode of action of a resistance inducer. *Pome Fruit Diseases IOBC/wprs Bull* 29: 123–127.

Bengtsson, M., Wulff, E., Lyngs Jørgensen, H.J., Pham, A., Lübeck, M. and Hockenhull, J. 2009. Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. *European Journal of Plant Pathology* 124: 187–198.

Bianco, L., Cestaro, A., Sargent, D.J., Banchi, E., Derdak, S., Di Guardo, M., Salvi, S., Jansen, J., Viola, R., Gut, I., Laurens, F., Chagné, D., Velasco, R., van de Weg, E. and Troggo, M. 2014. Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for Apple (*Malus × domestica* Borkh). *PLoS ONE* 9: e110377.

Boudichevskaia, A., Flachowsky, H. and Dunemann, F. 2009. Identification and molecular analysis of candidate genes homologous to HcrVf genes for scab resistance in apple. *Plant Breeding* 128: 84–91.

Brisset, M.-N., Cesbron, S., Thomson, S. V. and Paulin, J. 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106: 529–536.

- Broggini, G.A.L., Galli, P., Parravicini, G., Gianfranceschi, L., Gessler, C. and Patocchi, A. 2009. *HcrVf* paralogs are present on linkage groups 1 and 6 of *Malus*. *Genome* 52: 129–138.
- Broman, K.W., Wu, H., Sen, S. and Churchill, G.A. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889–890.
- Burketova, L., Trda, L., Ott, P.G. and Valentova, O. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances* 33: 994–1004.
- Caffier, V., Le Cam, B., Al Rifai, M., Bellanger, M.-N., Comby, M., Denancé, C., Didelot, F., Expert, P., Kerdraon, T., Lemarquand, A., Ravon, E. and Durel, C.-E. 2016. Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific quantitative trait locus. *Infection, Genetics and Evolution* 44: 541–548.
- Caffier, V., Didelot, F., Pumo, B., Causeur, D., Durel, C.E. and Parisi, L. 2010. Aggressiveness of eight *Venturia inaequalis* isolates virulent or avirulent to the major resistance gene *Rvi6* on a non-*Rvi6* apple cultivar. *Plant Pathology* 59: 1072–1080.
- Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., van de Weg, E., Expert, P., Denancé, C., Didelot, F., Le Cam, B. and Durel, C.-E. 2014. Erosion of quantitative host resistance in the apple \times *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution* 27: 481–489.
- Caffier, V., Patocchi, A., Expert, P., Bellanger, M.-N., Durel, C.-E., Hilber-Bodmer, M., Broggin, G.A.L., Groenwold, R. and Bus, V.G.M. 2015. Virulence characterization of *Venturia inaequalis* reference isolates on the differential set of *Malus* hosts. *Plant Disease* 99: 370–375.
- Calenge, F., Drouet, D., Denancé, C., van de Weg, W.E., Brisset, M.-N., Paulin, J.-P. and Durel, C.-E. 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 128–135.
- Calenge, F., Faure, A., Goerre, M., Gebhardt, C., van de Weg, W.E., Parisi, L. and Durel, C.-E. 2004. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94(4): 370–379.
- Howard, N.P., Troggio, M., Durel, C.-E., Muranty, H., Denancé, C., Bianco, L.; Tillman, J. and van de Weg, E. 2020. Integration of Infinium and Axiom SNP array data in the outcrossing species *Malus \times domestica* and causes for seemingly incompatible calls. *BioRxiv* 2020.09.01.276758.
- Le Cam, B., Sargent, D., Gouzy, J., Amselem, J., Bellanger, M.-N., Bouchez, O., Brown, S., Caffier, V., De Gracia, M., Debuchy, R., Duvaux, L., Payen, T., Sannier, M., Shiller, J., Collemare, J. and Lemaire, C. 2019. Population genome sequencing of the scab fungal species *Venturia inaequalis*, *Venturia pirina*, *Venturia aucupariae* and *Venturia asperata*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 9: 2405–2414.
- Celton, J.M., Tustin, D.S., Chagné, D. and Gardiner, S.E. 2009. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genetics and Genomes* 5: 93–107.
- Costa, F., van de Weg, W.E., Stella, S., Dondini, L., Pratesi, D., Musacchi, S. and Sansavini, S. 2008. Map position and functional allelic diversity of Md-Exp7, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus \times domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics and Genomes* 4: 575–586.
- Dalgaard, P. 2010. R development core team (2010): R: A language and environment for statistical computing. *Computer p*, <http://www.r-project.org/>.

- Dugé de Bernonville, T., Marolleau, B., Staub, J., Gaucher, M. and Brisset, M.-N. 2014. Using molecular tools to decipher the complex world of plant resistance inducers: an apple case study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 11403–11411.
- Durel, C.-E., Denancé, C. and Brisset, M.-N. 2009. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes ‘Evereste’ and *Malus floribunda* clone. *NRC Research Press* 147: 139–147.
- Durel, C.E., Parisi, L., Laurens, F., van de Weg, W.E., Liebhard, R. and Jourjon, M.F. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome* 46: 224–234.
- Emeriewen, O.F., Wöhner, T., Flachowsky, H. and Peil, A. 2019. *Malus* hosts–*Erwinia amylovora* interactions: strain pathogenicity and resistance mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 10: 1–7.
- Gozzo, F. and Faoro, F. 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 12473–12491.
- Hassan, M.A.E. and Buchenauer, H. 2007. Induction of resistance to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 151–158.
- Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F. and McFerson, J.R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 671–683.
- Ishiga, T., Iida, Y., Sakata, N., Ugajin, T., Hirata, T., Taniguchi, S., Hayashi, K. and Ishiga, Y. 2020. Acibenzolar-S-methyl activates stomatal-based defense against *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* in cabbage. *Journal of General Plant Pathology* 86: 48–54.
- Johnson, K.B., Smith, T.J., Temple, T.N., Gutierrez, E., Elkins, R.B. and Castagnoli, S.P. 2016. Integration of acibenzolar-S-methyl with antibiotics for protection of pear and apple from fire blight caused by *Erwinia amylovora*. *Crop Protection* 88: 149–154.
- De Jong, H., Reglinski, T., Elmer, P.A.G., Wurms, K., Vanneste, J.L., Guo, L.F. and Alavi, M. 2019. Integrated use of *Aureobasidium pullulans* strain CG163 and acibenzolar-S-methyl for management of bacterial canker in kiwifruit. *Plants* 8: 287.
- Khajuria, Y.P., Kaul, S., Wani, A.A. and Dhar, M.K. 2018. Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke. *Tree Genetics & Genomes* 14: 16.
- Khan, M.A., Durel, C.E., Duffy, B., Drouet, D., Kellerhals, M., Gessler, C. and Patocchi, A. 2007. Development of molecular markers linked to the “Fiesta” linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome* 50 : 568–577.
- Laloi, G., Vergne, E., Durel, C.E., Le Cam, B. and Caffier, V. 2017. Efficiency of pyramiding of three quantitative resistance loci to apple scab. *Plant Pathology* 66: 412–422.
- Lê Van, A., Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Chauveau, A., Brunel, D., Le Cam, B. and Durel, C.-E. 2013. Differential selection pressures exerted by host resistance quantitative trait loci on a pathogen population: a case study in an apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *New Phytologist* 197: 899–908.
- Lê Van, A., Gladieux, P., Lemaire, C., Cornille, A., Giraud, T., Durel, C., Caffier, V. and Le Cam, B. 2012. Evolution of pathogenicity traits in the apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications* 7: 694–704.
- Li, C., Wei, M., Ge, Y., Zhao, J., Chen, Y., Hou, J., Cheng, Y., Chen, J. and Li, J. 2020. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reactive oxygen species metabolism in apple exocarp induced by acibenzolar-S-methyl. *Food Chemistry* 308: 125663.

- Liebhard, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., van de Weg, E. and Gessler, C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10: 217–241.
- Liebhard, R., Koller, B., Patocchi, A., Kellerhals, M., Pfammatter, W., Jermini, M. and Gessler, C. 2003. Mapping quantitative field resistance against apple scab in a “Fiesta” x “Discovery” progeny. *Phytopathology* 93: 493–501.
- MacHardy, W.E. 1996. Apple scab biology, epidemiology and management. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Maisonneuve, B., Allen-aubouard, C. and Pitrat, M. 2013. Effect of plant genotype on the efficacy of stimulators of plant defences in two horticultural pathosystems. *IOBC-WPRE Bulletin* 89: 327–331.
- Malnoy, M., Martens, S., Norelli, J.L., Barny, M.-A., Sundin, G.W., Smits, T.H.M. and Duffy, B. 2012. Fire Blight: applied genomic insights of the pathogen and host. *Annual Review of Phytopathology* 50: 475–494.
- Marolleau, B., Gaucher, M., Heintz, C., Degrave, A., Warneys, R., Orain, G., Lemarquand, A. and Brisset, M. 2017. When a plant resistance inducer leaves the lab for the field: integrating ASM into routine apple protection practices. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–11.
- Matsuo, Y., Novianti, F., Takehara, M., Fukuhara, T., Arie, T. and Komatsu, K. 2019. Acibenzolar-S-methyl restricts infection of *Nicotiana benthamiana* by *Plantago Asiatica* mosaic virus at two distinct stages. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32: 1475–1486.
- Maxson-Stein, K., He, S., Hammerschmidt, R. and Jones, A.L. 2002. Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Disease* 86: 785–790.
- McDonald, B.A. and Linde, C. 2002. Pathogen Population Genetics, Evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–379.
- McMullen, M.D., Byrne, P.F., Snook, M.E., Wiseman, B.R., Lee, E.A., Widstrom, N.W. and Coe, E.H. 1998. Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1996–2000.
- Oliveira, M.D.M., Varanda, C.M.R. and Félix, M.R.F. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters* 15: 152–158.
- Van Ooijen, J. 2006. JoinMap® 4, software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Wageningen, the Netherlands: Kyazma BV.
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107: 19–28.
- Pal, K.K. and McSpadden Gardener, B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor* 1–25.
- Parisi, L. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* 83: 533.
- Parlevliet, J.E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens, present situation. *Euphytica* 124: 147–156.
- Patocchi, A., Wehrli, A., Dubuis, P.-H., Auwerkerken, A., Leida, C., Cipriani, G., Passey, T., Staples, M., Didelot, F., Pillion, V., Peil, A., Laszakovits, H., Rühmer, T., Boeck, K., Baniulis, D., Strasser, K., Vávra, R., Guerra, W., Masny, S., Ruess, F., Le Berre, F., Nybom, H., Tartarini, S., Spornberger, A., Pikunova, A.,

- Bus, V.G.M. 2020. Ten years of vinqest: first insight for breeding new apple cultivars with durable apple scab resistance. *Plant Disease* 104: 2074 – 2081
- Paulin, J.P. and Samson, R. 1973. Fire blight in France. II. Characters of the strains of *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al., 1920, isolated from a Franco-Belgian focus. *Ann. Phytopathol.* 5: 389–397.
- Pawlowski, M.L., Bowen, C.R., Hill, C.B. and Hartman, G.L. 2016. Responses of soybean genotypes to pathogen infection after the application of elicitors. *Crop Protection* 87: 78–84.
- Peil, A., Emeriewen, O.F., Khan, A., Kostick, S. and Malnoy, M. 2020. Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *Journal of Plant Pathology*.
- Di Pierro, E.A., Gianfranceschi, L., Di Guardo, M., Koehorst-van Putten, H.J., Kruisselbrink, J.W., Longhi, S., Troglio, M., Bianco, L., Muranty, H., Pagliarani, G., Tartarini, S., Letschka, T., Lozano Luis, L., Garkava-Gustavsson, L., Micheletti, D., Bink, M.C., Voorrips, R.E., Aziz, E., Velasco, R., Laurens, F. and van de Weg, W.E. 2016. A high-density, multi-parental SNP genetic map on apple validates a new mapping approach for outcrossing species. *Horticulture Research* 3: 16057.
- Pilet-Nayel, M.-L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.-C., Fournet, S., Durel, C.-E. and Delourme, R. 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–9.
- da Rocha, A.B. and Hammerschmidt, R. 2005. History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortTechnology* 15: 518–529.
- Rodríguez-Álvarez, M.X., Boer, M.P., van Eeuwijk, F.A. and Eilers, P.H.C. 2018. Correcting for spatial heterogeneity in plant breeding experiments with P-splines. *Spatial Statistics* 23: 52–71.
- Romero, A.M., Kousik, C.S. and Ritchie, D.F. 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Disease* 77: 189–194.
- Le Roux, P.M.F., Khan, M.A., Broggin, G.A.L., Duffy, B., Gessler, C. and Patocchi, A. 2010. Mapping of quantitative trait loci for fire blight resistance in the apple cultivars “Florina” and “Nova Easygro.” *Genome* 53: 710–722.
- Shahini Sough, F., Keshavarzi, M., Hassanzade, N., Hashemi, M., Abdollahi, H. and Tawosi, M. 2010. In vitro evaluation of acibenzolar-S-methyl on inhibition of fire blight in apple cv. Golden Delicious. *Iran. J. Plant Path.* 46: 77–78.
- Sharma, K., Butz, A.F. and Finckh, M.R. 2010. Effects of host and pathogen genotypes on inducibility of resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 59: 1062–1071.
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C.L., van de Weg, W.E., van Kaauwen, M.P.W., Walser, M., Kodde, L.P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C.E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C. and Patocchi, A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomes* 2: 202–224.
- Soriano, J.M., Madduri, M., Schaart, J.G., van der Burgh, A., van Kaauwen, M.P.W., Tomic, L., Groenwold, R., Velasco, R., van de Weg, E. and Schouten, H.J. 2014. Fine mapping of the gene *Rvi18* (V25) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* 34: 2021–2032.
- Soufflet-Freslon, V., Gianfranceschi, L., Patocchi, A. and Durel, C.-E. 2008. Inheritance studies of apple scab resistance and identification of *Rvi14*, a new major gene that acts together with other broad-spectrum QTL. *Genome* 51: 657–667.
- Tripathi, D., Jiang, Y. and Kumar, D. 2010. *SABP2*, a methyl salicylate esterase is required for the

systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Letters* 584: 3458–3463.

Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J. and Katagiri, F. 2009. Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genetics* 5: e1000772.

Vallad, G.E. and Goodman, R.M. 2004. Review & interpretation in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44: 1920–1934.

Vinatzer, B.A., Patocchi, A., Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S. and Gessler, C. 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding* 123: 321–326.

Walters, D.R., Ratsep, J. and Havis, N.D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64: 1263–1280.

Warneys, R., Gaucher, M., Robert, P., Aligon, S., Anton, S., Aubourg, S., Barthes, N., Braud, F., Cournol, R., Gadenne, C., Heintz, C., Brisset, M. and Degrave, A. 2018. Acibenzolar-S-methyl reprograms apple transcriptome toward resistance to rosy apple aphid. *Frontiers in Plant Science* 9: 1–16.

van de Weg, E., Di Guardo, M., Jänsch, M., Socquet-Juglard, D., Costa, F., Baumgartner, I., Broggin, G.A.L., Kellerhals, M., Troggio, M., Laurens, F., Durel, C.E. and Patocchi, A. 2018. Epistatic fire blight resistance QTL alleles in the apple cultivar ‘Enterprise’ and selection X-6398 discovered and characterized through pedigree-informed analysis. *Molecular Breeding* 38: 5.

Wiesel, L., Newton, A.C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E.M., Birch, P.R.J. and Hein, I. 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–13.

Wöhner, T.W., Flachowsky, H., Richter, K., Garcia-Libreros, T., Trognitz, F., Hanke, M. V. and Peil, A. 2014. QTL mapping of fire blight resistance in *Malus ×robusta* 5 after inoculation with different strains of *Erwinia amylovora*. *Molecular Breeding* 34: 217–230.

Yamamoto, T., Kimura, T., Saito, T., Kotobuki, K., Matsuta, N., Liebhard, R., Gessler, C., van de Weg, W.E. and Hayashi, T. 2004. Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map. *Acta Horticulturae* 663: 51–56.

Youssef, K., Roberto, S., Colombo, R., Canteri, M. and Elsalam, K. 2019. Acibenzolar-S-methyl against *Botrytis* mold on table grapes in vitro and in vivo. *Agronomy Science and Biotechnology* 5: 52.

Ziadi, S., Poupard, P., Brisset, M., Paulin, J.-P. and Simoneau, P. 2001. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 33–43.

h- Supplementary Tables and Figures

Supplementary Table S1. List of microsatellite markers added to the genetic map

Marker Name	Marker type	Linkage group	Reference
CH05g08	SSR	T1	(Liebhard et al., 2002)
CH-Vf1	SSR	T1	(Vinatzer et al., 2004)
HB04p	SSR	T1	(Broggini et al., 2009)
Hi02c07	SSR	T1	(Silfverberg-Dilworth et al., 2006)
KA4b	SSR	T1	(Yamamoto et al., 2004)
Md-Exp7	SSR	T1	(Costa et al., 2008)
NZmsCN879773	SSR	T1	(Celton et al., 2009)
Vf2ARD	SCAR	T1	(Boudichevskaia et al., 2009)
CH02d08	SSR	F11	(Liebhard et al., 2002)
CH04h02	SSR	F11	(Liebhard et al., 2002)
Rvi18SSR	SSR	F11	(Soriano et al., 2014)
CH01h01	SSR	F17	(Liebhard et al., 2002)
CH04f08	SSR	F17	(Liebhard et al., 2002)
CH05g03	SSR	F17	(Liebhard et al., 2002)
GD96	SSR	F17	(Hokanson et al., 1998)
Hi02f12	SSR	F17	(Silfverberg-Dilworth et al., 2006)
Hi03c05	SSR	F17	(Silfverberg-Dilworth et al., 2006)

Supplementary Table S2. Mean values (\pm standard-deviation) of AUDPC, relative effectiveness of ASM, coefficient of variation of individual BLUPs (CV), broad-sense heritability (h^2) and phenotypic variation explained by all detected resistance QTLs (global R^2) against scab (*V. inaequalis* isolate EU-B04; experiment Vi-B04_2) and fire blight (*E. amylovora* isolate CFPB1430; experiment Ea-1430_2) in the TxF progeny. Values for the sub-population qT1- are indicated within brackets. Effectiveness of ASM is computed as: (Mean-water – Mean-PRI)/Mean-water.

Experiment	Treatment	Mean	Effectiveness ASM (%)	CV	h^2	Global R^2
Vi-B04_2	water	22.9 \pm 26.2		1.03 [0.47] _{qT1-}	0.89	56.1 [68.8] _{qT1-}
	ASM	5.1 \pm 8.9	78	1.62 [0.59] _{qT1-}	0.85	56.3 [56.7] _{qT1-}
Ea-1430_2	water	4.2 \pm 2.5		0.30	0.51	30.2
	ASM	2 \pm 1.5	52	0.43	0.56	26.1

Supplementary Table S4. Parameters associated with the quantitative trait loci (QTLs) identified for disease resistance against scab (experiment Vi-B04_1, whole population) in the TxF progeny after water- or ASM-treatment.

Trait	Treatment	Linkage group	Position	LOD ^a	R ²	CI ^b
Vi-B04_1	water	T1	43.00	77.1	69.9	41.01 – 44.23
		T13	3.58	6.3	2.8	0.00 – 6.80
		F3	12.19	1.6	-	-
		F11	6.00	8.9	7.7	0.00 – 20.98
		<i>F12</i>	<i>4.00</i>	<i>3.3</i>	<i>0.6</i>	<i>0.00 – 6.87</i>
		F17	18.92	16.7	12.8	16.52 – 20.90
		T1	43.03	46.1	60.0	41.01 – 44.23
	ASM	T13	3.58	0.8	-	-
		F3	1.96	0.3	-	-
		<i>F11</i>	<i>4.75</i>	<i>4.3</i>	<i>6.9</i>	<i>0.00 – 20.98</i>
		F12	19.28	2.3	-	-
		F17	18.92	15.9	24.9	16.52 – 20.90

^a LOD thresholds were obtained after permutations (n=1000): 5.5 (Vi-B04_water) and 5.4 (Vi-B04_ASM). Significant QTLs are shown in bold. Suggestive QTLs with LOD score between 3.0 and the LOD threshold are shown in italics. QTLs being insignificant in a condition but significant in another are shown in grey.

^b position of 2-LOD support QTL confidence interval borders

Supplementary Table S5. Parameters associated with the quantitative trait loci (QTLs) identified for disease resistance against scab (experiment Vi-B04_2) and fire blight (experiment Ea-1430_2) in the TxF progeny after water- or ASM-treatment.

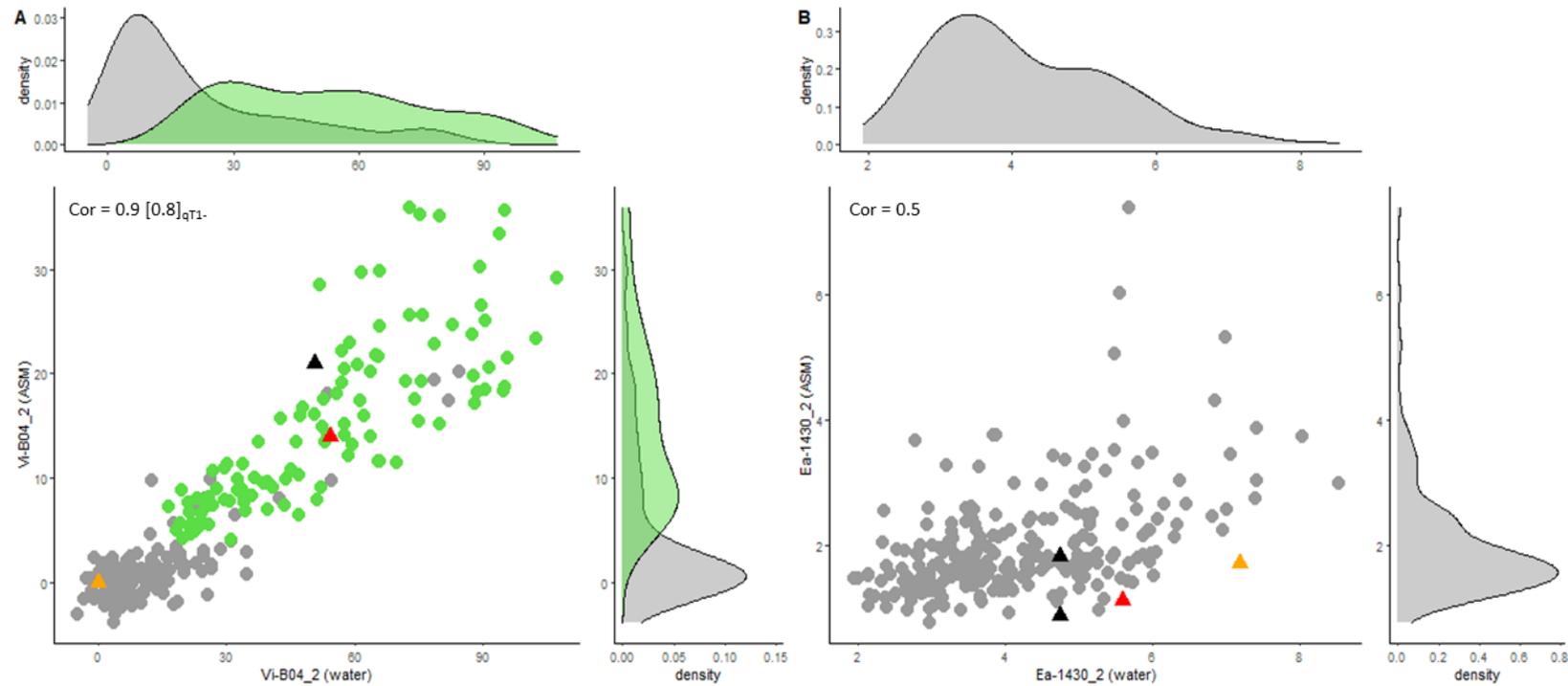
Trait	Treatment	Linkage group	Position	LOD ^a	R ²	CI ^b		
Vi-B04_2	water	T1	43.03	35.2	40.42	41.01 – 44.23		
		T13	44.94	2.1	-	-		
		F3	13.36	1.6	-	-		
		F11	5.53	5.3	4.99	0.00 – 7.91		
		F12	25.99	3.9	3.54	0.00 – 46.60		
		F17	18.92	14.4	13.30	16.52 – 20.90		
		T1	43.03	34.5	48.1	41.01 – 45.43		
	ASM	T13	0.40	1.1	-	-		
		F3	22.88	2.1	-	-		
		F11	5.53	2.9	-	-		
		F12	25.99	2.2	-	-		
		F17	18.92	12.5	21.8	16.52 – 20.90		
		Vi-B04_2_qT1-	water	T13	0.40	5.4	12.7	0.00 – 6.80
				F3	13.36	4.3	4.9	9.81 – 18.54
F11	20.98			5.2	13.8	8.69 – 26.31		
F12	25.99			4.9	11.2	20.46 – 31.56		
F17	18.92		14.3	37.3	16.52 – 22.48			
ASM	T13		0.40	3.3	3.3	0.00 – 6.80		
	F3		13.36	3.9	5.4	8.25 – 18.54		
	F11	26.31	5.4	6.9	20.98 – 33.17			
Ea-1430_2	water	F12	24.82	3.7	7.9	20.46 – 31.56		
		F17	18.92	19.2	33.7	16.52 – 20.90		
		T1	7.64	1.5	-	-		
		T3	27.16	5.0	9.4	21.57 – 32.02		
		T5	63.66	4.1	6.3	57.93 – 65.65		
		T7	3.19	1.1	-	-		
		T15	29.70	3.6	9.3	21.68 – 32.50		
	ASM	F1	29.65	1.1	-	-		
		F5	47.65	4.4	7.4	42.08 – 61.62		
		F7	65.12	1.8	-	-		
		F15	86.70	3.2	4.2	81.15 – 92.65		
		T1	0.40	3.3	5.1	0.00 – 58.27		
		T3	15.93	1.3	-	-		
		T5	49.55	5.1	5.3	43.24 – 53.14		
ASM	T7	23.12	4.1	4.5	15.73 – 29.10			
	T15	40.23	2.5	-	-			
	F1	26.12	5.9	7.0	15.4 – 31.63			
	F5	47.65	3.9	9.1	42.08 – 61.62			
	F7	63.13	1.6	-	-			
	F15	96.57	1.1	-	-			

^a LOD thresholds were obtained after permutations (n=1000): 4.70 (Vi-B04_water); 4.50 (Vi-B04_ASM); 5.82 (Vi-B04_qT1_water); 7.33 (Vi-B04_qT1_ASM); 4.77 (Ea-1430_water); 5.27 (Ea_1430_ASM). Significant QTLs are shown in bold. Suggestive QTLs with LOD score between 3.0 and the LOD threshold are shown in italics. QTLs being insignificant in a condition but significant in another are shown in grey. ^b position of 2-LOD support QTL confidence interval borders

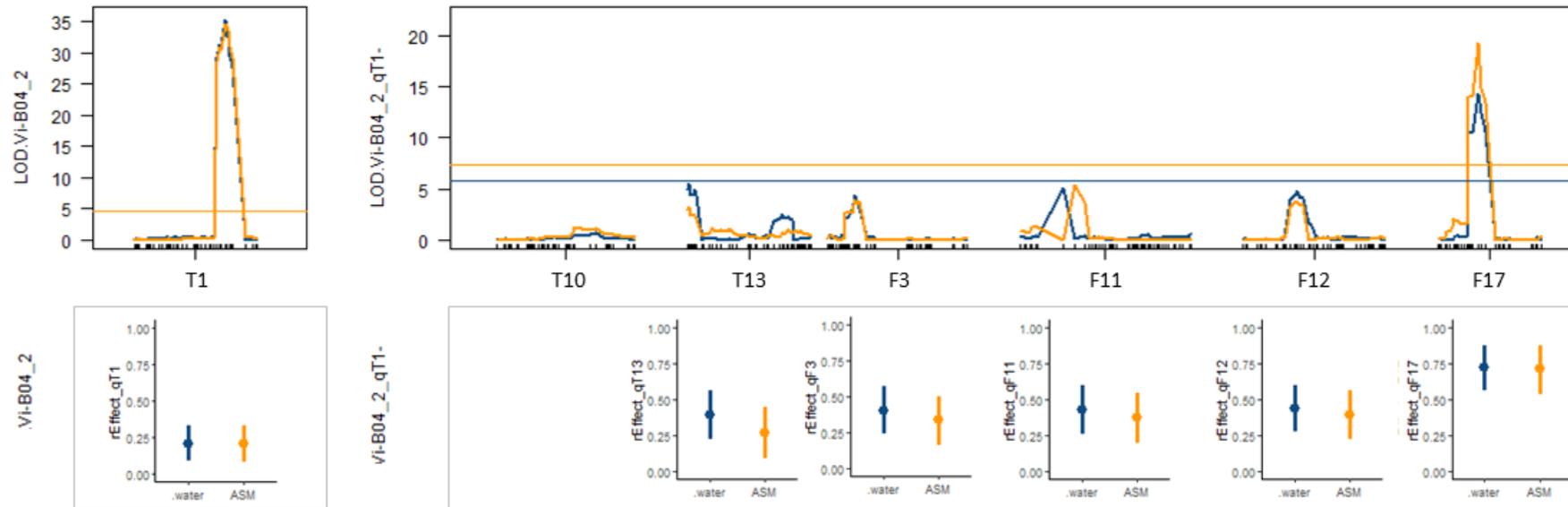
Supplementary Table S6. Interactions between significant and suggestive QTLs identified in Vi-B04_2, Vi-B04_2_{qT1}- and Ea-1430_2 experiments.

Trait	QTLs combination	water					ASM				
		AA:AA	AB:AA	AA:AB	AB:AB	F-value ^a	AA:AA	AB:AA	AA:AB	AB:AB	F-value ^a
Vi-B04_2	qF11:qF17	29.8	33.2	11.1	20.6	5.4 *	-	-	-	-	-
	qT1:qF17	-	-	-	-	-	17.0	0.5	5.9	-0.1	5.5 *
Vi-B04_2 _{qT1} -	qT13:qF11	56.3	65.1	64.6	84.3	9.0 **	-	-	-	-	-
	qT13:qF17	78.1	97.2	53.0	63.7	7.7 **	-	-	-	-	-
	qF12:qF17	90.1	83.7	65.8	47.9	5.0 *	-	-	-	-	-
Ea-1430_2	qT3:qT15	4.0	5.0	3.8	3.9	10.5 **	-	-	-	-	-
	qT5:qF5	4.0	3.7	5.0	4.1	7.0 **	-	-	-	-	-
	qT1:qF5	-	-	-	-	-	1.8	1.8	2.4	1.9	4.8 *
	qF1:qF5	-	-	-	-	-	1.9	1.8	2.4	1.8	4.0 *

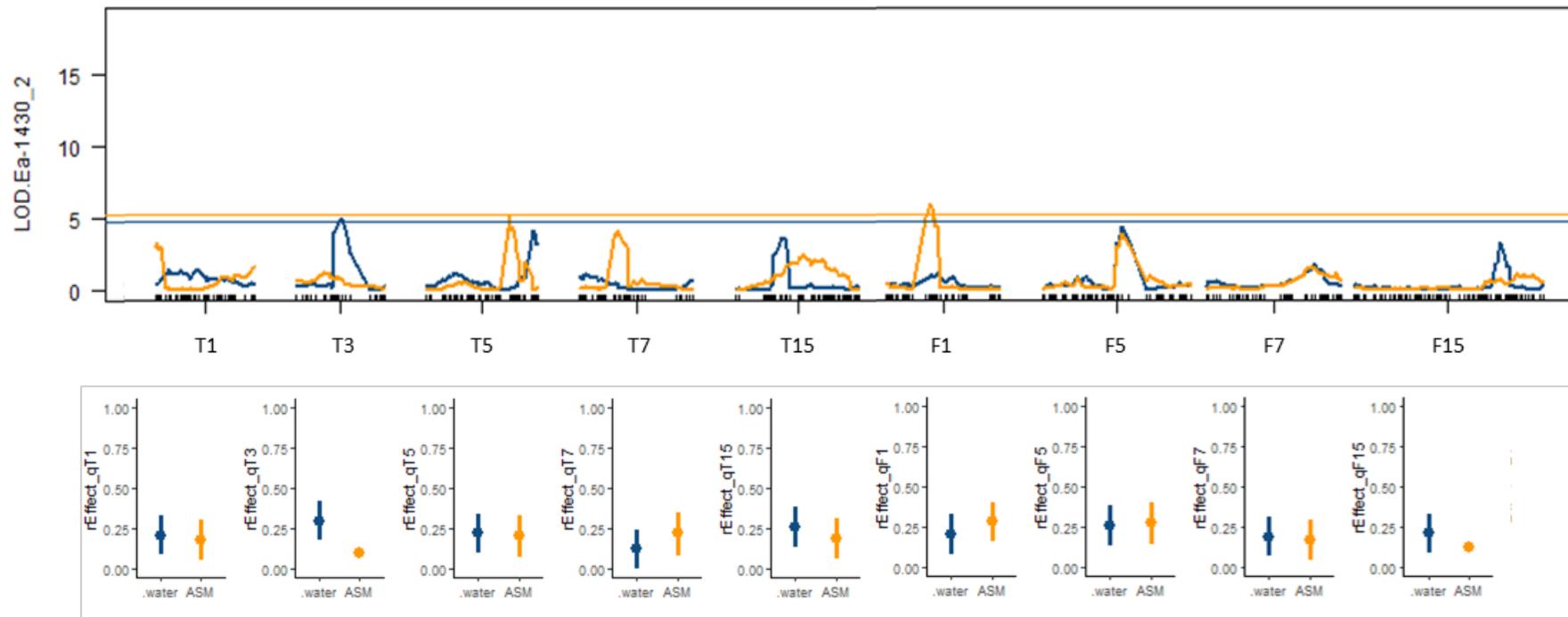
^a F-value of the variance analysis Fisher-test where stars represent the significance of the test at the risk of 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.005 (***).



Supplementary Figure S1. Relationship between disease severity (BLUP estimates) for water- and ASM- treated individuals of the TxF progeny in (A) Vi-B04_2 and (B) Ea-1430_2 experiments. Distributions of BLUPs are shown in the upper (water control) and right (ASM treatment) part of each graph where the complete population is represented in grey and the sub-population qT1- (i.e., individuals selected as not-carrying the resistance allele of the major QTL qT1) in green. The same color code is used in the graph where the green dots are superimposed on the grey dots. Control and parental genotypes are shown with triangles in orange (TN10-8), red (Fiesta) and black (Gala and Golden Delicious). Cor is the Pearson coefficient of correlation between water and ASM BLUPs. Value for the sub-population qT1- is indicated within brackets.



Supplementary Figure S2. LOD score curves of QTLs involved in resistance against scab (Vi-B04_2) for each treatment identified in the TxF progeny (upper part) and relative effects (rEffects) of these QTLs (lower part). Blue and orange colors represent respectively the water control and ASM treatment. LOD score thresholds are drawn as horizontal lines with the respective colors. In each rEffect plot, mean and standard deviation of each rEffect, calculated with bootstrapping, are represented by a point and a vertical bar respectively, with the respective blue and orange color for water-control and ASM-treatment respectively.



Supplementary Figure S3. LOD score curves of QTLs involved in resistance against fire blight (Ea-1430_2) for each treatment identified in the TxF progeny (upper part) and relative effects (rEffects) of these QTLs (lower part). Blue and orange colors represent respectively the water control and ASM treatment. LOD score threshold are drawn as horizontal lines with the respective colors. In each rEffect plot, mean and standard deviation of each rEffect, calculated with bootstrapping, are represented by a point and a vertical bar respectively, with the respective blue and orange color for water-control and ASM-treatment respectively.

Supplementary Table S3. Summary of the genetic map of the TxF progeny. For each linkage group of each parent, SNP markers are ordered according to their genetic position given in centimorgan (cM).

Marker name	Parental map	Linkage group	Position (cM)
SNP_FB_0673808	TN10-8	1	0.00
SNP_FB_1115557	TN10-8	1	0.40
SNP_FB_1114723	TN10-8	1	0.79
SNP_FB_0411478	TN10-8	1	1.19
SNP_FB_0671554	TN10-8	1	1.59
SNP_FB_1108202	TN10-8	1	2.38
SNP_FB_0417197	TN10-8	1	5.65
SNP_FB_0417642	TN10-8	1	6.05
SNP_FB_0948172	TN10-8	1	7.25
SNP_FB_0448193	TN10-8	1	7.64
SNP_FB_0318984	TN10-8	1	8.84

Extrait du tableau

2- Complémentation de la résistance par l'ASM : focus sur le QTL qT1

Le QTL qT1 colocalise avec le gène majeur de résistance à la tavelure *Rvi6* et serait potentiellement un homologue de ce gène, donc impliqué dans la reconnaissance de *Vi*. Cependant, ce QTL présente un spectre d'action partiel vis-à-vis d'une gamme de souches contrastées de *Vi* (Calenge et al., 2004), c'est-à-dire un effet QTL significatif vis-à-vis de certaines souches, mais une absence d'effet QTL vis-à-vis d'autres souches. De plus, l'agressivité de souches prélevées en verger sur des génotypes porteurs de l'allèle de résistance au niveau de ce QTL, « qT1+ », est plus forte que celle de souches prélevées sur les génotypes « qT1- », ce qui peut indiquer l'existence de souches 'virulentes' sur qT1+ (virqT1), (Caffier et al., 2016). La reconnaissance des souches 'avirulentes' (AvirqT1) de *Vi* par le produit de l'allèle de résistance qT1+ pourrait donc être qualifiée d'imparfaite ou de partielle. Cette reconnaissance imparfaite entraînerait un effet partiel de qT1 sur la réduction de la maladie, contrastant avec une reconnaissance 'parfaite' ('complète') qui correspondrait à une situation 'gène-pour-gène' classique où le gène majeur confère une réduction totale de la maladie (immunité totale). Parlevliet and Zadoks, (1977) ont parlé de modèle 'gène mineur-pour-gène mineur' dans ce cas.

En l'absence d'ASM, qT1 est bien considéré comme un QTL car il induit une réduction partielle de la sensibilité à la tavelure et l'ASM est très efficace dans cette classe de QTL (>90%, **Figure 24, Tableau 7** chapitre III), rendant la plupart des génotypes de cette classe presque totalement résistants. L'ASM étant appliqué avant l'inoculation, nous avons exploré, dans cette partie du chapitre, la complémentation de la résistance du QTL qT1 par l'ASM pour explorer si l'effet de l'ASM serait suffisamment fort pour changer le statut de qT1 en le faisant passer d'un statut de gène-mineur (QTL) à un statut de gène-majeur (résistance totale).

Pour évaluer l'effet de compensation de qT1 par l'ASM dans le test phénotypique Vi-B04_1, les AUDPC des génotypes porteurs de l'allèle de résistance et de sensibilité au niveau du QTL qT1 (et porteurs de l'allèle de sensibilité au 3 autres principaux QTLs qT13, qF11 et qF17) pour les conditions témoin (Eau) et après un traitement à l'ASM ont été comparés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Sensibilité moyenne des géotypes porteurs de l'allèle de résistance (qT1+) et de sensibilité (qT1-) au niveau du QTL qT1 dans les conditions témoin (Eau) et après un traitement à l'ASM dans le test Vi-B04_1 et efficacité relative de l'ASM et de qT1+.

	qT1+	qT1-	Efficacité qT1
Vi-B04_1_Eau	26.8	103.2	74 %
Vi-B04_1_ASM	6.6	76.0	91 %
Efficacité ASM	76 %	26 %	

L'ASM en prétraitement renforce de 17% l'effet du QTL qT1 (efficacité = 91%) comparativement à la condition témoin (efficacité = 74%).

Au sein des 10 individus qT1+ ciblés ici (c.à.d. retenus après filtration sur qT13-, qF11-, qF17-), aucun individu ne présente une AUDPC_Eau nulle (la plus faible AUDPC_Eau est égale à 3). qT1 se comporte donc comme un vrai QTL (= effet vraiment partiel) en l'absence des autres QTLs. Après un pré-traitement ASM, il n'y a que deux individus parmi les 10 qui atteignent une AUDPC_ASM égale à 0. Donc, à nouveau qT1 ne confère majoritairement qu'un effet partiel puisque 80% des individus qT1+ présentent une AUDPC_ASM non nulle, malgré la moyenne des 10 individus à seulement 6,6. De ce fait, on peut conclure que le prétraitement à l'ASM ne permet pas de faire passer qT1 d'un statut de gène mineur (QTL) en condition témoin (Eau) à un statut de gène majeur (résistance complète). qT1 conserve un 'vrai' comportement de QTL avec ASM. La reconnaissance 'imparfaite' du facteur d'avirulence hypothétique ('AvirqT1') d'une souche comme EU-B04 par qT1 ne peut pas être complètement compensée par la dose d'ASM utilisée, malgré son effet moyen très significatif.

Deux hypothèses mécanistiques pourraient expliquer de tels résultats : Si la reconnaissance du facteur 'AvirqT1' par le QTL qT1 est imparfaite, alors le traitement à l'ASM ne permettrait de compléter la résistance de ce QTL (pour le 'transformer' en gène majeur) que s'il intervenait lui-même comme signal de reconnaissance ou en aval, dans la voie métabolique déclenchée par le QTL. Or la probabilité que l'ASM intervienne dans la même voie que le QTL sans en moduler l'effet de façon significative (résultats décrits dans la partie IV-1) est faible. Par ailleurs, il est aussi possible que la différence entre les niveaux de sensibilité observés entre le gène majeur *Rvi6* et le QTL qT1 ne soit pas liée à la reconnaissance du facteur d'avirulence de la souche EU-B04, mais à la signalisation déclenchée en aval. Nous pourrions faire l'hypothèse que le QTL qT1 déclenche, en aval d'une reconnaissance 'parfaite' du facteur d'avirulence AvirqT1, une signalisation 'plus lente' ('imparfaite') que dans le cas d'une

situation gène-pour-gène. Dans cette seconde situation, l'ASM ne complèterait totalement le QTL que s'il intervenait spécifiquement au niveau de la réaction/voie métabolique qui limite le flux de signalisation, ce qui apparaît donc à nouveau peu probable au vu des résultats obtenus. D'autres hypothèses pourraient être proposées vu que les données dont nous disposons ne nous permettent pas de trancher ni d'exclure les différentes interprétations possibles.

Pour compléter cette approche, il serait intéressant d'explorer la complémentarité de qT1 avec les autres QTLs de résistances à la tavelure identifiés et vis-à-vis d'autres souches de *Vi*. Une évaluation approfondie sur EU-B04_1 (non détaillée ici) montre que ça n'est qu'en présence des allèles favorables des 3 autres QTL principaux (qT13+, qF11+, qF17+) que l'immunité totale (AUDPC nulle) est atteinte grâce au prétraitement ASM pour une majorité d'individus portant qT1+ (15/20, soit 75%) alors que seulement 7 individus sur 20 (35%) présentent une AUDPC nulle en condition témoin Eau. L'ASM semble donc apporter sa contribution à l'immunité totale en complément de l'action cumulée des différents QTLs ségrégeant dans cette descendance. L'ASM jouerait ainsi le rôle d'un « QTL supplémentaire » pour atteindre l'immunité totale.

3- Recherche de QTLs d'efficacité de l'ASM

Dans le but d'identifier des QTLs d'efficacité de l'ASM qui n'auraient pas été détectés par les analyses séparées puis comparées des données de sensibilité dans la condition témoin et après un traitement à l'ASM, nous avons travaillé sur les variables d'efficacité absolue ($BLUP_{water} - BLUP_{ASM}$), d'efficacité relative ($BLUP_{water} - BLUP_{ASM} / BLUP_{water}$) et sur l'effet du terme d'interaction Génotype x Traitement extrait d'un modèle d'analyse de variance ($AUDPC \sim \mu + \text{Génotype} + \text{Traitement} + \text{Génotype} \times \text{Traitement} + e$). Ces trois dernières variables représentent différents angles de vue d'une analyse 'conjointe' des données témoin et ASM.

Les résultats des analyses de ces trois nouvelles variables n'ont pas permis de détecter de nouveaux QTLs potentiellement impliqués dans l'efficacité de l'ASM. Le **Tableau 9** présente les résultats des analyses réalisées sur les termes d'efficacité absolue de l'ASM pour la résistance à *Vi* (Vi-B04_1_{qT1}) et *Ea* (Ea-1430_1). Les QTLs qT13 et qF3 ont été détectés pour la tavelure et le QTL qF7 pour le feu bactérien. Ces trois QTLs d'efficacité correspondent à des

QTLs de résistance, identifiés dans la partie IV-1 et dont l'effet est fortement réduit ou supprimé après un traitement à l'ASM.

Tableau 9 : Paramètres associés aux QTLs identifiés pour l'efficacité absolue de l'ASM pour la protection contre la tavelure (tests Vi-B04_1, sous-population qT1-) et le feu bactérien (test Ea-1430_1) dans la descendance TxF.

Trait	Variable	Groupe de liaison	Position	LOD ^a
Vi-B04_1 _{qT1-}	Efficacité ASM (BLUP _{water} - BLUP _{ASM})	<i>T13</i>	<i>4.38</i>	<i>3.8</i>
		F3	12.19	4.2
		F11	20.98	1.8
		F12	60.31	0.4
		F17	4.33	0.9
Ea-1430_1	Efficacité ASM (BLUP _{water} - BLUP _{ASM})	<i>T3</i>	<i>0</i>	<i>2.4</i>
		<i>T5</i>	<i>64.05</i>	<i>1.6</i>
		F5	51.28	1.7
		F7	69.46	9.2
		F15	78.80	1.8

^a LOD seuil obtenu par permutations (n=1000): 3,96 (Vi-B04_1_{qT1-}) et 4,35 (Ea-1430_1). Les QTLs significatifs sont représentés en gras. Les QTLs suggestifs dont les valeurs de LOD sont comprises entre 3 et le seuil de LOD sont représentés en italique. Les QTLs non significatifs mais identifiés pour la résistance (IV-1) sont représentés en gris.

Les analyses réalisées sur les autres variables d'efficacité ou d'interaction mettent en évidence au mieux les mêmes QTLs mais le plus souvent aucun QTL n'est détecté. Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats. La détection de QTL d'efficacité est contrainte par le calcul du terme d'efficacité. En effet l'efficacité (relative) est classiquement considérée comme le ratio entre la différence BLUP_{water} - BLUP_{ASM} et la valeur dans la condition témoin BLUP_{water}. Cette méthode de calcul réduit la distribution en imposant une distribution bornée entre 0 et 100% et rassemble sous des valeurs proches des génotypes parfois très contrastés. Une même valeur d'efficacité élevée peut être observée pour des génotypes sensibles qui répondent fortement au traitement à l'ASM (valeur du numérateur élevée) mais aussi pour des génotypes très résistants qui réagissent peu au traitement à l'ASM (même si le numérateur est faible, le dénominateur faible augmente la valeur du ratio). En calculant l'efficacité absolue (BLUP_{water} - BLUP_{ASM}), il est possible de s'affranchir de cet effet mais la moyenne étant liée à la variance, l'efficacité absolue est alors biaisée par un effet d'échelle (l'efficacité absolue diminue en fonction de l'effet des résistances génétiques dans les génotypes). La dernière

méthode de calcul consiste à extraire uniquement les effets d'interaction génotypes x traitement pour identifier les déterminants génétiques qui expliqueraient l'ampleur de la variation des génotypes autour la droite de régression (à se représenter mentalement lorsque l'on observe la **Figure 25**). Cependant la faible variation des génotypes autour de cette droite et la variabilité intra-génotype n'ont pas permis de détecter de nouveaux QTLs.

4- Exploration des gènes candidats sous les intervalles des principaux QTLs

En complément de ces résultats, nous avons exploré les gènes candidats positionnels situés dans les intervalles de confiances des QTLs de résistance. La liste des gènes compris dans l'intervalle de chaque QTL a été extraite à partir des données d'annotation du génome GDDH13 (<https://iris.angers.inra.fr/gddh13/the-apple-genome-downloads.html>). Les intervalles retenus correspondent aux intervalles les plus étroits sur l'ensemble des détections de QTL réalisées (**Tableau 10**). Lorsque les intervalles pour un même QTL sont différents en fonction du test ou de la condition, l'intervalle du QTL avec le LOD le plus élevé a été retenu. Les bornes physiques des intervalles ont été identifiées par blast sur le génome (jbrowse interne).

Tableau 10 : Intervalles de confiance des QTLs de résistance à *Vi* et *Ea* détectés dans la descendance TxF.

QTL	Test	Condition	IC (cM)	IC (Mb)	Nombre de gènes prédits
qT1	Vi-B04_1	témoin	3.2	0.9	122
qT10	Vi-Z14	témoin	10.8	2.5	338
qT13	Vi-B04_1qT1-	témoin	10.0	3.8	542
qF3	Vi-B04_1qT1-	témoin	14.6	1.1	133
qF11	Vi-B04_1qT1-	ASM	7.9	2.4	266
qF12	Vi-B04_1qT1-	témoin	13.6	6.5	458
qF17	Vi-B04_1qT1-	témoin	4.4	1.7	168
qT3	Ea-1430_1	ASM	12.0	2.1	451
qT5	Ea-1430_1	témoin	18.8	10.7	1211
qF5	Ea-1430_1	ASM	9.9	4.8	1222
qF7	Ea-1430_1	témoin	4.3	1.6	173
qF15	Ea-1430_1	témoin	10.2	13.0	498

Les intervalles considérés réunissent entre 122 et 1222 gènes candidats positionnels (**Tableau 10**). Nous avons choisi d'explorer la liste de gènes candidats sous les QTLs qT1, qF11 et qF17 pour la tavelure et le QTL qF7 pour le feu bactérien. Ce choix a été défini par le nombre de gènes dans l'intervalle (<300) et l'effet du QTL dans la résistance.

Parmi les 122 gènes dans l'intervalle de qT1, 23 gènes n'ont pas d'annotation, 3 sont des pseudogènes et 6 codent des protéines inconnues. Au final, 90 gènes sont annotés comme codant des protéines (Annexe - **Tableau S1**). Des hypothèses fortes sur le QTL qT1 ont déjà été présentées précédemment comme allèle d'un récepteur LRR extracellulaire de type Cf (résistance de la tomate à *Cladosporium fulvum*) (Xu and Korban, 2002; Belfanti et al., 2004; Paris et al., 2009). Les 8 gènes codant les deux groupes de 4 *HcrVf* précédemment caractérisés (Xu and Korban, 2002) sont bien retrouvés parmi les 90 gènes de l'intervalle.

Parmi les 266 gènes dans l'intervalle de qF11, 42 gènes n'ont pas d'annotation, 17 sont des pseudogènes et 19 codent des protéines inconnues. Au final, 188 gènes sont annotés comme codant des protéines et représentent 104 fonctions uniques (Annexe - **Tableau S2**).

Parmi les 168 gènes de l'intervalle de qF17, 18 gènes n'ont pas d'annotation, 20 sont des pseudogènes et 20 codent des protéines inconnues. Au final, 110 gènes sont annotés comme codant des protéines et représentent 84 fonctions uniques (Annexe - **Tableau S3**).

Parmi les 173 gènes de l'intervalle de qF7, 19 gènes n'ont pas d'annotation, 7 codent pour des pseudogènes et 8 pour des protéines inconnues. Au final, 139 gènes sont annotés comme codant pour des protéines et représentent 95 fonctions uniques (Annexe - **Tableau S4**).

Des analyses d'expression ont été réalisées dans l'équipe dans le cadre de la thèse de Gaëlle Laloi (Laloi, 2016) pour comparer les gènes différentiellement exprimés entre les classes de QTLs sansQTL, F11F17, T1 et T1F11F17 avant, et 8h, 24h et 48h après inoculation avec *Vi*, à l'aide de la puce d'expression AryANE v1.0 (Celton et al., 2014). Les données d'expression des gènes candidats localisés dans les intervalles des QTLs qF11 et qF17 ont été explorés. Mais très peu de données d'expression étaient finalement disponibles pour les gènes ciblés. Nous avons donc choisi de ne pas détailler ces résultats dans cette partie. Ils sont cependant disponibles en Annexe - **Tableaux S5 et S6**.

5- Discussion chapitre IV

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux effets du traitement à l'ASM sur les QTLs de résistance et inversement l'effet des résistances génétiques sur l'efficacité de l'ASM pour comprendre la nature de l'interaction entre ces deux types de résistance. Les résultats de ce chapitre ont été discutés dans l'article et plus particulièrement les relativement faibles modulations de l'effet des QTLs après le traitement ASM. Cette partie est un complément de discussion pour tenter de schématiser les mécanismes impliqués dans ces modulations, au regard des mécanismes connus de l'ASM et des QTLs. Etant plus spéculative, elle n'a pas été intégrée à l'article.

Cette démarche d'élaboration d'un modèle explicatif est réalisée à partir des résultats du test Vi-B04_1 dans lequel six QTLs de résistance à la tavelure ont été identifiés : qT1, qT13, qF3, qF11, qF12 et qF17. Afin de tenter d'expliquer l'interaction entre les QTLs et le traitement à l'ASM, les mécanismes enclenchés par chaque QTL, avant et après traitement ASM, ont été schématisés par des voies métaboliques selon leur implication potentielle dans la perception de l'agent pathogène, la signalisation ou les défenses (**Figure 32**). Les mécanismes sous-jacents aux QTLs de résistance du pommier sont actuellement encore peu ou pas caractérisés. Cependant, d'après les hypothèses disponibles sur ces mécanismes, qT1 pourrait être un récepteur LRR extracellulaire de type *HcrVf* et les QTLs qF11 et qF17 interviendraient plutôt dans des voies de défenses (Calenge et al., 2004; Caffier et al., 2014, 2016; Laloi et al., 2017). Au vu des effets faibles des autres QTLs, nous avons considéré pour cette modélisation que ces derniers seraient plutôt impliqués, comme qF11 et qF17, dans des voies de défense et non dans la perception du pathogène ou la signalisation. Mais certains d'entre eux pourraient néanmoins être impliqués dans une reconnaissance partielle (imparfaite) menant à des effets faibles. D'après les résultats dans la condition témoin, seuls les QTLs qF11 et qF17 sont en interaction (cf VI-1-results) entre eux avec un contraste entre les allèles de qF11 plus fort en présence de l'allèle de résistance de qF17 donc nous avons fait l'hypothèse que ces deux QTLs interviennent dans la même voie, avec qF17 situé en amont de qF11, et que tous les autres QTLs interviennent dans des voies indépendantes. L'effet de chaque QTL est représenté par le flux métabolique modulé par le QTL, représenté par l'épaisseur de la flèche qui le suit, dans le schéma.

Dans la condition témoin (Figure 32-haut), les QTLs qT1 et qF17 ont les effets les plus forts, ils sont donc certainement impliqués dans des voies métaboliques très actives en présence de leur allèle de résistance respectif. Du fait de l'interaction entre l'ASM, analogue de SA, et certains QTLs, nous supposons que leur voie de défense est liée directement ou indirectement (activation indirecte ou corréglulation SA/JA) à la signalisation SA. Les QTLs qF12 et qF17, étant exacerbés par l'application d'ASM, interviennent très probablement dans une voie directement régulée par SA et par interaction qF11 également. Des indications moléculaires (chapitre V) indiquent que qT1 pourrait activer des voies de type signalisation SA. Par contre, il n'y a aucune évidence sur l'implication de SA dans les voies des QTLs qF3 et qT13 donc l'interaction entre la voie SA et ces QTLs pourrait être indirecte ou inexistante.

Lors de l'application d'ASM (**Figure 32** - bas, les molécules pénètrent dans les cellules et miment des molécules de SA (Tripathi et al., 2010). Du fait de l'augmentation de la concentration en molécules d'ASM et donc potentiellement en précurseurs en amont de la voie SA, on peut supposer une augmentation du flux de la signalisation SA. La signalisation SA active des facteurs de transcription, comme NPR1, qui vont activer plusieurs autres voies de défense potentiellement régulées par certains QTLs.

Le flux métabolique peut être augmenté par l'ASM en faveur d'un QTL si ce QTL est placé en aval de l'une des voies stimulées, c'est le cas du QTL qF12. L'effet du QTL est sans doute augmenté parce que les voies en amont sont activées. Pour le QTL qF17 dont l'effet est également augmenté, c'est une voie parallèle qui serait stimulée puisque l'effet de qF11 n'est pas modulé dans le même sens après un traitement à l'ASM alors que ces deux QTLs sont complémentaires (pour rappel, la combinaison des allèles favorables au niveau de ces deux QTLs augmente la résistance). Le flux serait donc augmenté par l'ASM en faveur d'un composé A, mais le composé A pourrait interagir avec le produit du QTL qF17 et donc dévier la voie de qF17 en défaveur de celle de qF11. Cela reviendrait à observer une augmentation de l'effet de qF17 réparti sur les deux voies et un maintien de l'effet de qF11, puisque la voie n'est pas supprimée, mais réduite. Les mêmes régulations défavorables pourraient être déduites pour les QTLs qF3 et qT13. En activant la voie du composé B par l'ASM, les voies de défense dans lesquelles sont impliquées les QTLs qF3 et qT13 deviennent très limitées voire supprimées. Le précurseur de ces deux voies étant détourné en faveur de la voie du composé B, il devient limitant pour les voies des deux autres QTLs. Cette hypothèse expliquerait la disparition du

QTL qF3 puisqu'il n'y a plus de contraste entre les allèles résistant/sensible au niveau de ce QTL. Par contre la réduction de l'effet de qT13, et non sa disparition peut provenir de phénomènes de compensation entre les voies. Le précurseur de la voie principale n'étant plus disponible, une autre voie, moins efficace, serait régulée pour maintenir le flux lié à ces défenses. En termes de mécanisme moléculaire, cette compensation pourrait être expliquée par l'affinité de certaines enzymes pour un substrat préférentiel. Si le substrat principal disparaît, le site actif de l'enzyme peut reconnaître un autre substrat secondaire, mais l'efficacité de l'enzyme est réduite. Le QTL qT1 est un récepteur qui au contact d'un PAMP ou d'un effecteur déclenche une cascade de signalisation. L'effet du QTL est donc associé aux voies de défense induites par la signalisation. La réduction après ASM de l'effet du QTL qT1 observée pour une souche de *Vi* pourrait donc être expliquée par une déviation de plusieurs voies activées par la signalisation. Ces voies seraient déviées en faveur d'autres voies de défense donc l'effet du QTL diminuerait puisque le contraste entre les allèles résistant/sensible serait réduit par l'implication d'autres intermédiaires. Par contre l'efficacité de l'ASM plus importante pour la classe de QTL T1 (Cf. chapitre III) proviendrait du détournement de précurseurs des voies associées à qT1 qui seraient remobilisés dans d'autres voies. Une autre hypothèse, non représentée en Figure 32, serait que qT1 ne mobilise que faiblement (ou même pas du tout) la voie de signalisation SA, et que son effet diminue en présence d'ASM du simple fait de la mobilisation prépondérante de cette voie SA au dépend de la voie qu'il déclenche.

D'après le schéma hypothétique proposé, nous pourrions théoriquement identifier des QTLs de réactivité à l'ASM parmi les gènes impliqués dans les voies des composés A et B après l'application du traitement à l'ASM. Les détections réalisées sur les variables de sensibilité mais aussi sur les variables d'efficacité relative, absolue et d'interaction génotypes x traitement n'ont pas permis l'identification de tels QTLs de réactivité. Soit les méthodes utilisées ne permettent pas de décrire suffisamment la contribution des génotypes à la variation de l'efficacité de l'ASM, soit il n'y a pas de variants alléliques associés à ces voies dans la descendance étudiée, mais nous pourrions en identifier dans d'autres populations.

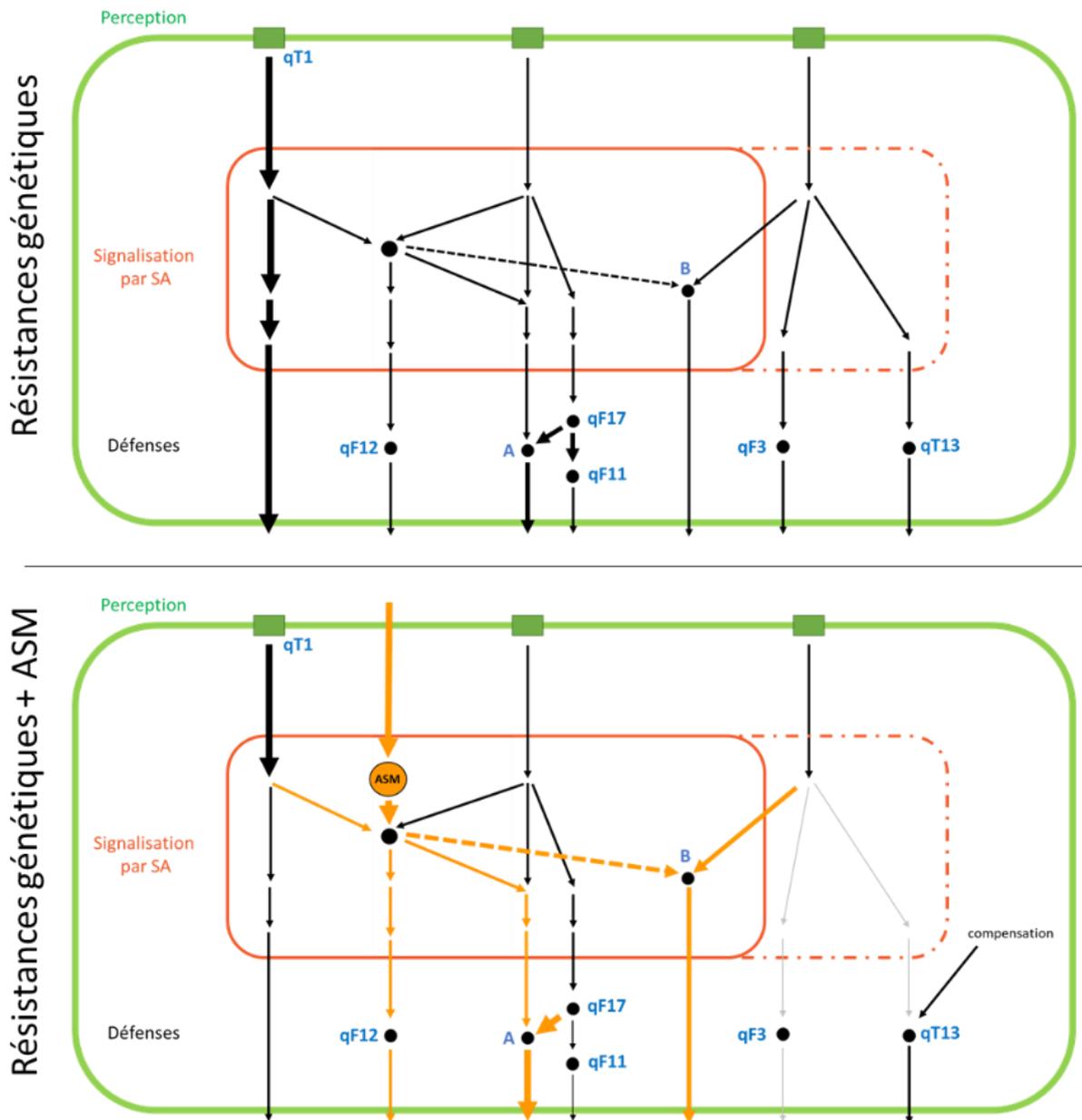


Figure 32 : Schématisation d’hypothèses mécanistiques permettant d’expliquer la modulation de l’effet des QTLs dans la résistance après une application d’ASM.

Quoiqu’il en soit, ce schéma est une représentation très simplifiée d’une des hypothèses possibles de mécanismes d’interaction entre les résistances génétiques et les résistances induites par l’ASM, mais de nombreux autres scénarios pourraient être proposés. De plus, les résultats de cartographie indiquent que les modulations restent limitées et souvent non significatives donc les mécanismes proposés dans cette partie restent hypothétiques. Cependant les effets observés sont certainement minimisés par une complexité de compensation et de redondance fonctionnelle (Tsuda et al., 2009; Delplace et al., 2020), donc

les tendances observées et les mécanismes proposés dans le schéma ne sont sans doute pas contradictoires de la réalité biologique. Une étude approfondie des mécanismes moléculaires à l'échelle transcriptomique, protéomique et métabolomique dans le cadre de l'interaction permettrait de valider certaines hypothèses mécanistiques proposées ici.

Chapitre V :

Mécanismes moléculaires constitutifs
et induits impliqués dans les
résistances génétiques et les
résistances induites par les SDP

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances génétiques et/ou induites par les SDP. L'interactivité entre ces résistances mise en évidence dans le chapitre III, suggère que des mécanismes intrinsèques aux variétés influenceraient l'efficacité des traitements SDP. Pour comprendre les interactions entre ces résistances, nous avons donc suivi l'expression de gènes de défense et l'accumulation de métabolites à différentes étapes de la mise en place des défenses.

Nous avons donc étudié les variations des niveaux de défense constitutive et induite en lien avec les résistances génétiques et l'induction par les SDP. L'objectif de cette partie est d'identifier des facteurs moléculaires dont le niveau d'expression ou l'accumulation est corrélé au niveau de résistance quantitative observés après infection et de comprendre comment ces facteurs s'articulent avec les résistances génétiques et l'induction par un SDP.

Les résultats de ce chapitre s'inscrivent dans le cadre de deux projets de recherche « TavInnov » et « PREDIRE ». Le projet de recherche du métaprogramme INRAE SMaCH « TavInnov » a été initié en 2017 pour caractériser la durabilité de stratégies de protection, et en ce qui nous concerne, l'utilisation conjointe de génotypes résistants et de SDP. Un des enjeux de ce projet est d'analyser les mécanismes de défenses du pommier mis en jeu dans l'association et leurs impacts sur le développement de la tavelure, par le suivi de l'expression de gènes de défense et le dosage des métabolites secondaires dans les génotypes représentants des classes de QTLs. Le projet « PREDIRE », financé par le programme régional RFI « Objectif végétal » et initié en 2016, vise à caractériser les variations des niveaux de défense constitutive par le suivi de l'expression de gènes de défense dans une large collection de variétés (CCe). Cette caractérisation a pour but de chercher à identifier des gènes dont l'expression permettrait de prédire les niveaux de résistances quantitatives vis-à-vis de la tavelure et du feu bactérien et d'efficacité de protection des SDP.

Ce chapitre est découpé en trois parties. La première partie concerne la caractérisation des familles de gènes de défense du pommier. Les deux parties suivantes correspondent à l'étude du rôle des défenses constitutives et induites dans les résistances génétiques et/ou induites par les SDP.

1- Caractérisation bio-informatique des défenses du pommier

a- Démarche de caractérisation des défenses et méthodologies d'analyse

Les technologies utilisées pour la caractérisation des défenses ont été décrites dans le chapitre II « Matériel et méthode ». La partie ci-dessous vise à décrire plus en détail l'échantillonnage, l'acquisition des données et la méthodologie des analyses statistiques utilisées pour la caractérisation des défenses.

Temps de prélèvement et typologie de défenses

Plusieurs échantillons de feuilles ont été prélevés afin d'explorer les défenses constitutives, les défenses induites par les SDP, les défenses induites par l'infection et les défenses induites par une combinaison des SDP et de l'infection selon les modalités suivantes :

- Les défenses constitutives : Echantillons de la condition témoin, prélevés au temps J0 (avant infection).
- Les défenses induites par un traitement SDP : Comparaison des échantillons de plantes traitées avec un SDP (à J-2) ou dans la condition témoin, prélevés au temps J0.
- Les défenses induites par l'infection : Comparaison des échantillons de plantes de la condition témoin, prélevés aux temps J3 et J5 (après infection) ou au temps J0.
- Les défenses induites par l'infection et le traitement SDP : Comparaison des échantillons de plantes traitées avec un SDP ou dans la condition témoin, prélevés aux temps J3 et J5 (après infection) ou au temps J0.

La comparaison des profils d'expression et des empreintes métaboliques entre ces groupes d'échantillons nous a permis de rechercher les marqueurs expressionnels ou fonctionnels impliqués dans les résistances génétiques et/ou dans la réponse au traitement SDP.

Echantillonnage

Dans la population de représentants des classes QTLs, trois séries d'échantillons ont été prélevées en parallèle de tests de sensibilité à la tavelure (**Tableau 12**). La première série est constituée de 2 représentants (génotypes) par classe de QTL en 2 copies (série uniquement analysée pour le dosage métabolique) et les deuxième et troisième séries sont composées de

4 représentants par classe de QTLs en 4 copies (répétitions biologiques). Dans chacune des séries, des échantillons ont été prélevés sur des génotypes traités à l'eau ou avec un SDP, inoculés ou non inoculés pour caractériser les défenses constitutives et induites. Les échantillons de la troisième série (2020) ont été prélevés et étaient en cours d'analyse au moment de la rédaction de ce mémoire. Seuls les résultats des deux premières séries (2018 et 2019) sont donc présentés dans ce manuscrit.

Dans les collections CCe et CCe_32, seules les défenses constitutives ont été caractérisées par étude d'expression. Dans la collection CCe_32, une série d'échantillons, composée de 3 copies de chacune des 32 variétés de la collection, a été prélevée (**Tableau 12**). Pour corrélérer ces défenses constitutives aux niveaux de résistance quantitative et à l'efficacité de SDP, quatre tests de sensibilités (deux à la tavelure : Vi-B04_{32_1}, Vi-B04_{32_2}, et deux au feu bactérien : Ea-1430_{32_1}, Ea-1430_{32_2}) avec et sans traitement SDP ont été réalisés.

Dans la collection CCe, un ensemble d'échantillons, composé de 1 à 2 copies de chacune des 376 (408-32=376) variétés disponibles, a été prélevée (**Tableau 12**). Du fait du nombre important d'échantillons à prélever et de différences de stade physiologique des plants greffés, cinq séries de prélèvements ont été réalisées à cinq dates différentes et sur deux saisons de croissance (printemps et automne 2017). Une grande partie des variétés a été échantillonnée sur deux dates différentes pour chacune des copies permettant d'établir un grand nombre de 'ponts' entre les dates de prélèvements pour les ajustements statistiques. Parmi les 376 variétés, 29 ont été prélevées en 2 copies sur la même série de prélèvement que la collection CCe_32. Une population d'échantillons composée des 32 variétés de la CCe_32 et de ces 29 variétés (nommée ensuite CCe_61) a été utilisée pour sélectionner trois gènes de défense à tester sur la CCe entière.

Tableau 12 : Liste des échantillons prélevés par population et conditions testées.

Descendance		Collection	
Complète	Représentants des classes de QTL	CCe_32	CCe
-	2018 : [2 cop x 2 G x 4 classes] x 4 T x 3 tps 2019 : [4 cop x 4 G x 4 classes] x 2 T x 3 tps 2020 : [4 cop x 4 G x 4 classes] x 2 T x 3 tps	[3 cop x 32 G] _{Eau, J0}	[1 ou 2 cop x 376 G] _{Eau, J0}

Les abréviations représentent le nombre de répétition biologique (cop), de génotypes (G), de traitements (T) et de temps (tps) testés.

Analyse de l'expression de gènes de défense

Dans la population de représentants de classe de QTL : Parmi les 28 gènes de la qPFD, 13 gènes ont été présélectionnés sur quelques représentants des classes de QTL (données non présentées). Ces gènes ont été sélectionnés pour couvrir un maximum de grandes catégories de voies de défenses du pommier et pour leur niveau de variabilité d'expression. D'après des recherches menées dans l'équipe sur la diversité génétique de pommier (Urrestarazu et al., 2016), Golden Delicious est génétiquement assez proche des parents de la descendance TN10-8 et Fiesta. Nous avons donc considéré que la probabilité que des mutations soient présentes dans la zone d'hybridation des amorces est faible au sein des représentants des classes de QTL. Ce risque de polymorphisme SNP dans la zone d'hybridation des amorces a par contre été considéré plus loin dans l'analyse d'une diversité plus large (Cf. partie 1. b. ci-dessous). Donc seules l'efficacité et la spécificité des amorces, testées par qPCR, nous ont permis de valider ces couples pour cette partie de l'étude. La **Tableau 13** représente les 13 gènes sélectionnés et les voies de défenses dans lesquelles ces gènes sont impliqués.

Tableau 13 : Liste des gènes de défense sélectionnés pour explorer l'expression des défenses constitutives et induites dans les génotypes représentant des classes de QTL par RT-qPCR.

Gène	Abréviation	Fonction	Voie de défense
Pathogenesis related protein 4-Hevein like protein precursor	PR4	Chitinase	Protéines PR (Pathogenesis-related)
Pathogenesis related protein 10	PR10	Ribonucléase	
Agglutinine	AGG	Agglutination	Lectine (assimilée à une protéine PR)
Dihydroflavonol 4-reductase	DFR	Catalyse la conversion de la dihydroquercetin en leucocyanidin dans la synthèse des anthocyanines	Voie des phenylpropanoïdes
3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	HMGR	Biosynthèse des terpènes	Voie des Isoprénoïdes
Cysteine sulfoxide lyase (Alliinase)	CSL		Voie des cystéines sulfoxides
Callose synthase	CaIS	Biosynthèse de callose	Modification pariétale
Cinnamyl alcohol dehydrogenase	CAD	Biosynthèse de la lignine	
Nonexpressor of pathogenesis-related 1	NPR1	Co-régulateur transcriptionnel SA-dépendant	Voie de l'acide salicylique
WRKY transcription factor	WRKY	Facteur de transcription	
Lipoxygénase 2	LOX2	Biosynthèse de l'acide jasmonique	Voie de l'acide jasmonique
Jasmonate O-methyltransferase	JMT	Catalyse la méthylation du jasmonate	
Ethylene insensitive 3	EIN3	Facteur de transcription	Voie de l'éthylène

Les plaques qPCR ont été dessinées de façon à ce que chaque génotype soit analysé sur une seule plaque. En effet, une plaque qPCR correspond à l'expression des 13 gènes et des 3 gènes de ménage en triplicat technique pour les deux copies (répétitions biologiques) d'un même génotype, traité à l'eau et à l'ASM (((13+3) x3) x2) = 96 puits, **Figure 33**). Pour les prélèvements de 2019, les quatre copies de chaque génotype ont été poolées pour lisser la variabilité intra-génotype et gagner du temps. Des données d'expression ont été acquises pour les 4 génotypes par classe de QTL (4 classes de QTLs), les parents de la descendance (TN10-8 et Fiesta) et 2 témoins de sensibilité (Gala et Golden Delicious), ce qui correspond à 20 plaques qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	JMT	JMT	JMT	CAD	CAD	CAD	JMT	JMT	JMT	CAD	CAD	CAD
B	LOX2	LOX2	LOX2	CaIS	CaIS	CaIS	LOX2	LOX2	LOX2	CaIS	CaIS	CaIS
C	DFR	DFR	DFR	PR4	PR4	PR4	DFR	DFR	DFR	PR4	PR4	PR4
D	HMGR	HMGR	HMGR	PR10	PR10	PR10	HMGR	HMGR	HMGR	PR10	PR10	PR10
E	EIN3	EIN3	EIN3	AGG	AGG	AGG	EIN3	EIN3	EIN3	AGG	AGG	AGG
F	NPR1	NPR1	NPR1	CSL	CSL	CSL	NPR1	NPR1	NPR1	CSL	CSL	CSL
G	WRKY	WRKY	WRKY	GAPDH	GAPDH	GAPDH	WRKY	WRKY	WRKY	GAPDH	GAPDH	GAPDH
H	TuA	TuA	TuA	Actin	Actin	Actin	TuA	TuA	TuA	Actin	Actin	Actin

Figure 33 : Plan de plaque qPCR utilisé pour l'analyse de l'expression de 13 gènes de défense et des 3 gènes de ménage (Actin, TuA, GAPDH) en triplicat technique sur les représentants des classes de QTL. Chaque demi-plaque correspond à l'analyse des 13 + 3 gènes pour un traitement, encadré en bleu pour l'eau et en orange pour l'ASM, et un seul génotype (composé de 4 copies poolées de ce génotype).

Les données de Cq ont été obtenues par régression et l'expression relative a été calculée selon la formule $ExpR = \log(2^{-\Delta\Delta Cq})$. La moyenne géométrique des trois gènes de ménage (Actin, TuA et GAPDH) a été utilisée pour la normalisation des données d'expression entre échantillons et les expressions normalisées de chaque gène ont ensuite été rapportées à la moyenne de l'expression des génotypes de la classe sansQTL, traités à l'eau et prélevés. Les données ont été vérifiées et des corrections manuelles ont été réalisées pour retirer les répétitions techniques et/ou biologiques non cohérentes et les valeurs hors norme. La variation de l'expression constitutive et induite des gènes, au sein des classes de QTLs, a été étudiée par

des analyses de variance sous R. La répétabilité ou héritabilité au sens large a été calculée avec la fonction repeatability du package 'heritability'.

Dans les collections de variétés : La caractérisation bio-informatique et l'étude phylogénétique de 35 familles de gènes de défense (méthodologie détaillée dans le chapitre II) a permis de valider 13 couples d'amorces dont la liste sera présentée dans la partie 1b de ce chapitre. L'expression constitutive de ces 13 gènes a été analysée sur les 61 variétés issues de la CCe_61. A partir des résultats acquis sur cette population, 3 gènes ont été sélectionnés pour étudier leur expression sur l'ensemble de la CCe. Le choix de ces 3 gènes de défense sera également explicité dans la partie résultats.

Concernant l'acquisition des données d'expression sur la CCe_32, chaque plaque qPCR est composée d'une répétition biologique des 32 variétés en triplicat technique (**Figure 34**). Les trois répétitions biologiques de chaque variété sont donc dispersées sur trois plaques qPCR. L'expression d'un gène sur l'ensemble des échantillons (variétés x répétitions biologiques) est acquise par un lot de 3 plaques qPCR. Concernant l'acquisition des données d'expression sur les 29 variétés supplémentaires, chaque plaque est composée d'une répétition biologique des 29 variétés en triplicat technique et des deux répétitions biologiques des deux variétés « X00700 » (Eri Sagarra) et « X01349 » (Roxbury Russet) en duplicat technique. Ces deux variétés ont été ajoutées au plan de plaque comme des témoins inter-plaque et inter-série puisqu'ils appartiennent à la CCe_32 (Cf. Chapitre II-1-b). Les données d'expression de 13 gènes de défense et 3 gènes de ménage ont été acquises sur ces deux populations correspondant à 75 plaques qPCR.

A												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X00352-1	X00352-1	X00352-1	X01560-1	X01560-1	X01560-1	X07198-1	X07198-1	X07198-1	X08396-1	X08396-1	X08396-1
B	X00395-1	X00395-1	X00395-1	X01894-1	X01894-1	X01894-1	X07199-1	X07199-1	X07199-1	X08412-1	X08412-1	X08412-1
C	X00700-1	X00700-1	X00700-1	X02302-1	X02302-1	X02302-1	X07200-1	X07200-1	X07200-1	X08609-1	X08609-1	X08609-1
D	X00942-1	X00942-1	X00942-1	X02621-1	X02621-1	X02621-1	X08149-1	X08149-1	X08149-1	X08719-1	X08719-1	X08719-1
E	X01180-1	X01180-1	X01180-1	X02953-1	X02953-1	X02953-1	X08226-1	X08226-1	X08226-1	X08734-1	X08734-1	X08734-1
F	X01212-1	X01212-1	X01212-1	X04681-1	X04681-1	X04681-1	X08236-1	X08236-1	X08236-1	X08742-1	X08742-1	X08742-1
G	X01349-1	X01349-1	X01349-1	X06194-1	X06194-1	X06194-1	X08246-1	X08246-1	X08246-1	X09433-1	X09433-1	X09433-1
H	X01363-1	X01363-1	X01363-1	X07195-1	X07195-1	X07195-1	X08384-1	X08384-1	X08384-1	X09437-1	X09437-1	X09437-1

B												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X00404-1	X00404-1	X00404-1	X08245-1	X08245-1	X08245-1	X08732-1	X08732-1	X08732-1	X09153-1	X09153-1	X09153-1
B	X00600-1	X00600-1	X00600-1	X08253-1	X08253-1	X08253-1	X08738-1	X08738-1	X08738-1	X09167-1	X09167-1	X09167-1
C	X01705-1	X01705-1	X01705-1	X08381-1	X08381-1	X08381-1	X08751-1	X08751-1	X08751-1	X09252-1	X09252-1	X09252-1
D	X01853-1	X01853-1	X01853-1	X08414-1	X08414-1	X08414-1	X08933-1	X08933-1	X08933-1	X09389-1	X09389-1	X09389-1
E	X01982-1	X01982-1	X01982-1	X08415-1	X08415-1	X08415-1	X08972-1	X08972-1	X08972-1	X09936-1	X09936-1	X09936-1
F	X02646-1	X02646-1	X02646-1	X08488-1	X08488-1	X08488-1	X08981-1	X08981-1	X08981-1	X00700-1	X00700-1	X01349-A
G	X08239-1	X08239-1	X08239-1	X08515-1	X08515-1	X08515-1	X09090-1	X09090-1	X09090-1	X00700-A	X00700-A	X01349-A
H	X08244-1	X08244-1	X08244-1	X08699-1	X08699-1	X08699-1	X09134-1	X09134-1	X09134-1	X01349-1	X01349-1	H2O-1

Figure 34 : Exemple de plan de plaque qPCR utilisé pour l'analyse de l'expression de 13 gènes de défense et des 3 gènes de ménage en triplicat technique sur la CCe_32 (A) et la CCe_61 (B). Chaque plaque correspond à l'analyse d'un seul gène pour une répétition biologique (ici annotée par « -1 ») des 32 (A) ou 29 (B) variétés. Dans le plan de plaque B, les 9 cases entourées par une ligne en pointillés représentent deux génotypes témoins 'ponts' entre paires de plaque (2 répétitions biologiques par génotype 'pont' en duplicat technique) et un témoin négatif (H2O).

Concernant l'acquisition des données d'expression sur la CCe, les 347 (408-32-29=347) variétés en 1 ou 2 répétitions biologiques ont été réparties sur 16 plaques qPCR en duplicat technique (**Figure 35**). Les deux répétitions biologiques d'un même génotype ont été rassemblées sur la même plaque et les génotypes ont été dispersés de façon à ce que les différentes séries (dates) de prélèvement soient représentées sur toutes les plaques. Chaque plaque qPCR est donc composée d'environ 20 génotypes, de 2 variétés ponts en 1 répétition biologique et duplicat technique et d'une gamme de dilution (1/20, 1/100, 1/500 et 1/2500) d'un pool de l'ensemble des 347 échantillons en duplicat technique. Les 2 variétés ponts sont communes par couple de plaque et correspondent à des témoins inter-couple de plaque. La gamme de dilution est répétée sur l'ensemble des 16 plaques. Les données d'expression de 3 gènes de défense et de 3 gènes de ménage ont été acquises par l'analyse de 96 plaques qPCR.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X00036-1	X00036-1	X00036-A	X00036-A	X00129-1	X00129-1	X00129-A	X00129-A	X00156-1	X00156-1	X00156-A	X00156-A
B	X00263-1	X00263-1	X00263-A	X00263-A	X00337-1	X00337-1	X00337-A	X00337-A	X00342-1	X00342-1	X00342-A	X00342-A
C	X00344-1	X00344-1	X00344-A	X00344-A	X00380-1	X00380-1	X00380-A	X00380-A	X00421-1	X00421-1	X00421-A	X00421-A
D	X00429-1	X00429-1	X00429-A	X00429-A	X00443-1	X00443-1	X00443-A	X00443-A	X00468-1	X00468-1	X00468-A	X00468-A
E	X00522-1	X00522-1	X00522-A	X00522-A	X00530-1	X00530-1	X00530-A	X00530-A	H2O	H2O	Gamme	Gamme
F	X00534-1	X00534-1	X00534-A	X00534-A	X00557-1	X00557-1	X00557-A	X00557-A	X00048-1	X00048-1		
G	X00585-1	X00585-1	X00585-1	X00585-1	X00591-1	X00591-1	X00591-A	X00591-A	X00640-1	X00640-1	Gamme	Gamme
H	X00599-1	X00599-1	X00599-A	X00599-A	X00666-1	X00666-1	X00666-A	X00666-A	X01094-A	X01094-A		

Figure 35 : Exemple de plan de plaque qPCR utilisé pour l'analyse de l'expression de 3 gènes de défense et des 3 gènes de ménage en duplicat technique sur la CCe. Chaque plaque correspond à l'analyse d'un seul gène pour une répétition biologique (ici annotée par « -1 » ou « -A ») d'environ 20 variétés parmi les 347. Les cases blanches représentent trois génotypes ponts présents par paires de plaque, deux témoins négatifs (H2O) et une gamme de 4 points de dilution d'un pool de l'ensemble des échantillons d'ADNc présents sur l'ensemble des 16 plaques par gène.

Les données d'expression ont été analysées selon la même procédure que celle décrite pour la population de représentants de classe QTL. Du fait de la complexité du dessin expérimental et du nombre d'échantillons, les biais techniques ont été testés par analyse de variance pour vérifier leur influence sur la variation d'expression et réaliser un ajustement si nécessaire. L'effet de l'année d'acquisition des données d'expression (2017, 2018, 2019) a été testé sur la CCe_61, et les effets de séries de prélèvement (5 dates) et de plaques (16 plaques par gène) ont été testés sur les données d'expression de la CCe. Les variétés ponts et le point de dilution 1/20 correspondant à la dilution des ADNc des échantillons ont été utilisés pour évaluer l'effet plaque. Après l'ajustement, les expressions relatives ont été calculées en utilisant comme calibrateur :

- la moyenne de l'expression de l'ensemble des échantillons (61 variétés x 2 ou 3 répétitions biologiques) par gène pour la CCe_61
- la moyenne de l'expression des points de gamme 1/20ème sur les 16 plaques par gène pour la CCe

A partir des données d'expression relative, des études de variabilité entre génotypes et des études de corrélation avec les niveaux des sensibilités à la tavelure et au feu bactérien (sans ou après traitement avec un SDP pour la CCe_32) ont été effectuées. Aucune donnée de sensibilité après traitement SDP n'était disponible sur la CCe. La variabilité de l'expression des gènes de défense entre génotypes a été étudiée à travers le calcul des héritabilités (décrit

précédemment). Les corrélations entre l'expression des gènes de défense et les niveaux de sensibilité (AUDPC) ont été explorées par l'analyse de graphiques de corrélation et les calculs de coefficients de corrélation de Pearson, réalisés sous R avec les packages 'ggplot2' et 'corrplot'.

Détection de eQTL

Pour compléter la caractérisation de l'expression constitutive de gènes de défense, une détection de QTLs d'expression (eQTLs) a été menée par génétique d'association (GWAS) dans le but d'identifier les déterminants génétiques impliqués dans la variation de l'expression de ces gènes. Si le niveau d'expression d'un ou plusieurs de ces gènes est corrélé à la résistance ou l'efficacité de l'ASM, identifier des SNPs associés à la variation d'expression de ces gènes permettrait de prédire la résistance et/ou l'efficacité de l'ASM sur la base des allèles aux eQTL.

Les données de génotypage haute densité de 342 sur les 347 variétés étudiées de la Cc ont été obtenues par puce Axiom 487k (Bianco et al., 2016; Muranty et al., 2020) dans l'équipe. Les analyses GWAS ont été réalisées à partir de ces données de génotypage et des données d'expression constitutive des 3 gènes de défense étudiés en qPCR sur la Cc à l'aide du package MLM (Segura et al., 2012) sous R. Dans notre étude, l'ensemble des variétés de la Cc sont des variétés à dessert et ont une origine géographique européenne où la structuration a été évaluée comme étant très limitée (Urrestarazu et al., 2016). Nous avons donc considéré la structure génétique comme négligeable pour notre étude. L'analyse de GWAS a été réalisée à partir de la fonction 'mlmm' en intégrant au modèle statistique une matrice d'apparentement. La matrice d'apparentement K a été calculée pour tenir compte des relations d'apparentement variables entre les variétés de la Cc.

Dosage métabolique

Le dosage en métabolites a été réalisé sur deux séries de prélèvement. La première série est composée de deux génotypes en deux copies (répétitions biologiques) par classe de QTL. L'empreinte métabolomique de chaque génotype est étudiée sur trois temps (J0, J3, J6) et pour quatre conditions de traitement (Eau, ASM, PhP et Kendal). Cette première série a été réalisée pour calibrer l'expérimentation. Les résultats de ce dosage préliminaire ont permis

d'adapter le dessin expérimental pour améliorer la précision de l'analyse. En effet le faible nombre de copies par génotype et la forte variabilité intra-classe de QTL se sont révélés problématiques. De nouveaux génotypes plus homogènes en termes de résistance et de génotypage (prise en compte du QTL qT13) ont été sélectionnés et plus de copies par génotype ont été prélevées. La deuxième série de prélèvement est donc composée de quatre génotypes en quatre copies par classe de QTL. Les échantillons ont été dosés sur trois temps (J0, J3, J5) et pour deux conditions (Eau et ASM).

Les aires sous les pics des signaux métaboliques définis par le ratio masse/temps de rétention, interprétées comme les intensités de ces signaux et isolées à partir de l'analyse HPLC-MS, ont été analysées dans le logiciel R. Des analyses en composante principale (ACP) ont été réalisées afin d'explorer les structurations globales du métabolome en fonction des contrastes de QTL, de traitement SDP et/ou de l'infection. Cette analyse descriptive permet de représenter dans un plan à deux dimensions le maximum de variabilité sans a priori entre les échantillons, permettant de mettre en évidence des tendances de corrélation ou des structurations dans le jeu de données.

Afin d'explorer des voies métaboliques associées à des contrastes entre classes de QTLs, traitement et/ou infection, des représentations en 'volcano plot' ont été explorées à l'aide du logiciel MetaboAnalyst (Xia et al., 2009). Les 10 signaux accumulés différenciellement de manière la plus significative dans la condition de résistance ont été extraits de ces volcano plot. En complément, pour identifier les signaux les plus différenciellement accumulés en fonction des classes de QTL, traitement et/ou infection, des analyses discriminantes des moindres carrés partiels ou partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) en anglais ont été réalisées. Les 50 signaux les plus discriminants, identifiés par PLS-DA, ont été extraits par la sPLS-DA (sparse partial least squares discriminant analysis). Au sein des 50 signaux identifiés, seuls les signaux dont les valeurs de contribution à la sPLS-DA étaient supérieures à 0,2 ont été caractérisés (<15 signaux par comparaison). Les dizaines de signaux métaboliques extraits par ces deux approches statistiques ont été analysées avec le logiciel MS-Dial et la détermination des métabolites par comparaison avec les bases de données (publics et internes) dans le logiciel MS-Finder a été réalisée par Romain Larbat du LAE de Nancy. Seul un nombre limité de signaux par comparaison (<15) a été caractérisé à ce jour du fait du temps nécessaire aux analyses de détermination (blast manuel). Au final 174 signaux ont été

comparés aux bases de données mais seulement une cinquantaine ont pu être déterminés. Les ACP, PLS-DA et sPLS-DA ont été réalisées avec le logiciel R à l'aide des fonctions 'PCA' du package 'FactoMineR' et 'plsda' et 'splda' du package 'MixOmics'.

b- Résultat de caractérisation des familles de gène de défense, analyse phylogénétique et choix des gènes

Parmi les 35 familles de gènes étudiées, 27 interviennent dans la mise en place de barrières physiques ou chimiques, 5 dans la signalisation hormonale, 1 dans la transcription et les deux autres familles « affected by *Venturia inaequalis* » et « affected by *Erwinia amylovora* » correspondent à des gènes non annotés mais mis en évidence comme différentiellement exprimés dans les études d'expression menées avec la puce Aryane sur les deux agents pathogènes (**Tableau 14**). Puisque l'objectif est d'étudier les défenses constitutives et induites, la majorité des gènes analysés appartient à la classe des barrières physiques ou chimiques. En effet nous avons considéré que la signalisation et les activités transcriptionnelles n'étaient modulées qu'après une induction. Une part importante des familles de gènes est constituée de protéines PR car des précédents résultats ont mis en évidence une surexpression de ces gènes après application d'ASM (Dugé de Bernonville et al., 2014) ; ce sont donc des gènes potentiellement impliqués dans l'efficacité du traitement. Enfin, parmi les 28 gènes de la qPFD, 16 ont été retenus : ils interviennent dans les principales voies des barrières chimiques et/ou physiques donc nous avons considérés qu'ils sont plus susceptibles d'être exprimés différentiellement entre génotypes au niveau constitutif que ceux des voies de signalisation. De plus, la plupart de ces gènes sont sur-exprimés après traitement à l'ASM.

Les familles sont constituées de 2 à 72 séquences homologues. Le génome du pommier est entièrement dupliqué et l'homologie entre les groupes de liaison, schématisée dans la **Figure 3** a été exploré par (Daccord et al., 2017). L'isolement de plus de 2 séquences provient très probablement de ces évènements de duplication et de transposition ou d'acquisition/perte de gènes lors des croisements entre espèces de *Malus* (Feurtey et al., 2017; Peace et al., 2019). Les séquences nucléotidiques ont été analysées pour identifier les séquences codantes et non codantes (présence de codon stop ATG, erreurs de séquençage, ...) et caractériser la diversité

entre les gènes paralogues et homéologues. Cette étape a permis de mettre en évidence les pseudogènes et les séquences codantes, résumés dans le **Tableau 14** pour chaque famille de gène.

Tableau 14 : Synthèse des résultats de caractérisation bio-informatique et des analyses phylogénétiques des 35 familles de gènes de défense du pommier retenues.

Famille de gène	Abréviation	Classes et sous-classe de défense	qPFD	Caractérisation bio-informatique		Analyse phylogénétique			
				Nombre de séquences par famille (v1.1)	pseudo-gène	Séquences homologues	Organismes	Séquences sélectionnés	
Cysteine-rich secretory protein	PR-1	Protéines PR	oui	17	5	2	orge, tabac	6	
Glycosyl hydrolase family 17	PR-2		oui	72	16	1	Arabidopsis	8	
Chitinase class I	PR-3,PR-11		non	8	2	3	tabac, tomate, pommier	2	
Barwin domain protein	PR-4		oui	3	3	2	pomme de terre, riz	1	
Thaumatin	PR-5		oui	34	6	3	Polyporus umbellatus, riz	aucune	
serine protease inhibitor	PR-6		non	11	2	1	tomate	1	
Chitinase A/Glycosyl hydrolase family 18	PR-8		oui	21	10	2	Arabidopsis, soja	1	
Bet v1, Mal d1 family	PR-10		non	48	5	5	vigne, pommier	27	
Gamma thionin/defensin	PR-12		non	35	1	3	soja, luzerne, radis	2	
Thionin	PR-13		non	4	0	1	Arabidopsis	1	
Protease inhibitor/seed storage/LTP family	PR-14		oui	26	4	3	Arabidopsis, ail, tabac	aucune	
Cupin/germin/oxalate oxidase	PR-15,PR-16		oui	47	17	2	blé, vigne	31	
Plant basic secretory protein	PR-17		non	2	0	2	tabac, tomate	aucune	
Agglutinine	Agg		Assimilée à une protéine PR	Barrières chimiques et/ou physiques	oui	22	3	3	blé, ail, Pinelia ternata
Chalcone/stilbene synthase	CHS/STS	Voie des phénylpropanoïdes	oui		11	5	2	pin, arachide	5
Polyphenol oxidase	PPO	Voie des isoprénoïdes	oui		9	9	2	pomme de terre, pissenlit	3
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	HMGR		oui		4	12	2	pomme de terre, pommier	1
Farnesyl diphosphate synthase	FDS	Voie de la cystéine	non		2	0	2	Arabidopsis, tomate	aucune
Terpene Synthase	TPS		non		30	18	2	riz, maïs	6
Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase/Alliinase/CSL	CSL	Stress oxydant	oui		8	1	2	ail	4
Ascorbate Peroxidase	APOX		oui		9	3	2	Tabac, Arabidopsis	1
Glutathione S-transferase	GST		oui		47	13	3	blé, maïs	aucune
Pectinesterase	Pect	Modifications pariétales	oui		70	21	0	-	aucune
Cinnamoyl-CoA reductase/Epimerase	CAD		oui	49	22	3	Arabidopsis, riz, peuplier	1	
Glucan synthase/Callose synthase	GS/CS		non	12	4	3	Arabidopsis	2	
Pollen Ole e1/extensin	extensin		non	31	6	3	Arabidopsis, banane	1	
Pectate lyase C	-		non	24	6	2	Arabidopsis, café	aucune	
NPR/NIM family	NPR/NIM	Voie de l'acide salicylique	Signalisation	non	9	2	2	Arabidopsis, pommier	aucune
Salicylic acid carboxyl methyltransferase	SAM	Protéines Kinases		non	29	12	0	-	aucune
Wall-associated kinase	WAK			non	12	5	1	Arabidopsis	5
Receptor lectin kinase 1 (uncomplete)	-	Transport de l'auxine		non	27	21	3	Arabidopsis, tomate, tabac	aucune
aromatic and neutral amino acid transporter	-		non	64	11	2	Arabidopsis	3	
O-acetyltransferase	-	Transcription	non	4	0	2	Psoralea corylifolia, Arabidopsis	aucune	
Affected by Venturia inaequalis	-	Inconnu	non	23	23	-	-	aucune	
Affected by Erwinia amylovora	-		non	6	1	-	-	aucune	

Afin d'identifier la séquence à cibler pour le dessin des amorces qPCR, des analyses phylogénétiques ont été réalisées. L'objectif était d'identifier dans la littérature deux séquences orthologues identifiées dans d'autres organismes et dont l'activité dans la résistance à un stress biotique a été démontrée. Les résultats de ces recherches sont résumés dans le **Tableau 14**.

Pour 4 familles de gènes, aucune séquence homologue n'a pu être identifiée. Concernant les autres familles, 1 à 5 séquences homologues ont été identifiées et utilisées pour la construction d'arbres phylogénétiques. La **Figure 36** représente 3 exemples de résultats obtenus :

1. Pour certaines familles, une seule séquence de pommier a pu être isolée par son homologie aux séquences d'autres organismes, c'est le cas de la famille APOX par exemple. La séquence isolée (MD00G1029300) a donc été choisie comme cible pour le dessin des amorces dans ces familles.
2. Pour d'autres familles, un groupe de séquences a été isolé, la famille TPS par exemple. Dans cette situation, différents choix ont été fait en fonction de la diversité entre les séquences retenues :

- la séquence de pommier, la plus proche de celles d'autres organismes, a été utilisée comme cible. En utilisant l'exemple de la famille TPS, la séquence MD031214900 serait sélectionnée.

- une séquence consensus a été dessinée sur Multalin à partir des séquences de pommier, les plus proches de celles d'autres organismes. Ce choix a été fait lorsque les séquences de pommier présentaient une forte homologie. Dans l'exemple de la famille TPS, une séquence consensus serait définie à partir des séquences MD11G1236200 et MD11G1236600 par exemple après vérification de leur homologie.

- dans les cas où le nombre de séquences isolées était trop important ou l'homologie trop faible par rapport aux séquences d'autres organismes, aucune séquence n'a été retenue pour le dessin des amorces.

3. Dans les autres familles, des séquences différentes de pommier ont été mises en évidence pour leur homologie avec celles d'autres organismes. L'absence d'homologie partagée entre ces séquences n'a pas permis de construire des séquences consensus et ne

nous a pas permis de choisir une séquence cible. Cette situation est illustrée par la famille PR-14.

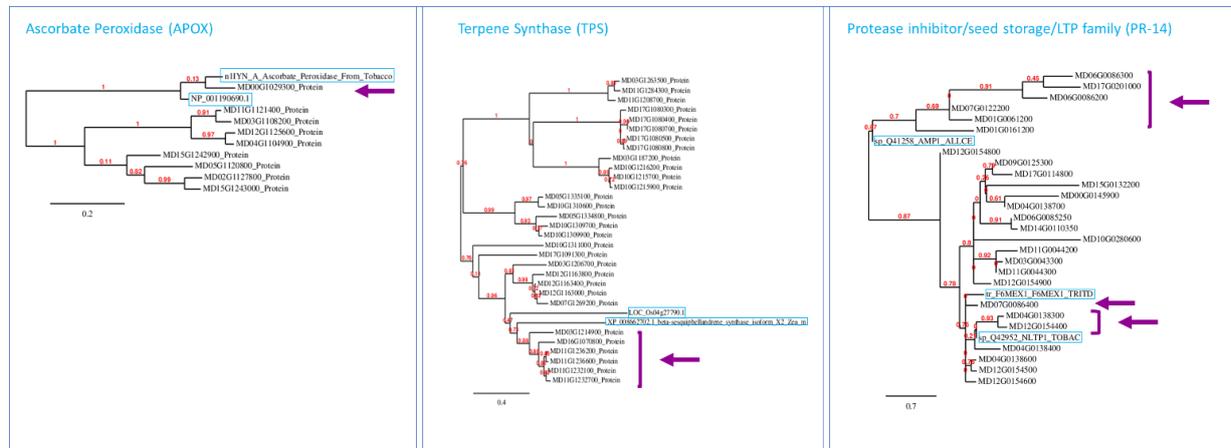


Figure 36 : Exemples d'arbre phylogénétique obtenus à partir des familles de trois gènes (APOX, TPS et PR-14) permettant d'isoler une séquence candidate (APOX), un ensemble de séquence (TPS) ou aucune des séquences (PR-14) pointées par les flèches violettes.

Suite aux filtres de validation bioinformatique et qPCR, seuls six couples d'amorce ont été validés par cette procédure pour les gènes PR-8, PR-10, Agg, PPO, APOX et extensin (Annexe - **Tableau S7**). Pour compléter la liste des amorces disponibles pour cette étude, 8 amorces de la qPFD qui n'avaient pas été retenues lors de la première sélection ont été testées, correspondant aux gènes FAR et FPPS de la voie des isoprénoïdes, DFR de la voie des phénylpropanoïdes, CalS impliqué dans les modifications pariétales, JMT et LOX2 de la voie de l'acide jasmonique, EIN3 de la voie de l'éthylène et WRKY de la voie de l'acide salicylique. Du fait de la diversité génétique des variétés de la CcE, les SNP des 8 amorces supplémentaires ont été explorées puisque lors de leur dessin, les informations de ZNP n'étaient pas disponibles. Chacune des amorces présente au plus 1 SNP (Annexe - **Tableau S8**), les couples ont donc été validés par RT-qPCR (pour leur spécificité) sur les différents sous-ensembles de la CcE (CcE_32, CcE_29, CcE). La liste finale des gènes étudiés sur la CcE_32 est présentée dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Liste des 13 gènes de défense sélectionnés pour explorer l'expression des défenses constitutives dans les collections de variétés CCe_32 et CCe_61 par RT-qPCR.

Famille de gène	Abbréviation	Classes et sous-classe de défense	
β -1,3-glucanase	PR-2	Protéines PR	Barrières chimiques et/ou physiques
Chitinase A/Glycosyl hydrolase family 18	PR-8		
Bet v1, Mal d1 family	PR-10		
Agglutinine	Agg	Assimilée à une protéine PR	
Polyphenol oxidase	PPO	Voie des phénylpropanoïdes	
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	HMGR	Voie des isoprénoïdes	
Farnesyl diphosphate synthase	FDS / FPPS		
Terpene Synthase	TPS / FAR		
Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase/Alliinase/CSL	CSL	Voie de la cystéine	
Ascorbate Peroxidase	APOX	Stress oxydant	
Cinnamoyl-CoA reductase/Epimerase	CAD	Modifications pariétales	
Glucan synthase/Callose synthase	GS/CS		
Pollen Ole e1/extensin	extensin		

2- Les défenses constitutives sont-elles impliquées dans l'efficacité des résistances génétiques et/ou induites par les SDP ?

a- Variabilité du niveau d'expression constitutive de gènes de défense dans les classes de QTLs

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances génétiques et/ou induites par les SDP, l'expression constitutive de 13 gènes de défense a été suivie par RT-qPCR dans les génotypes de 4 classes contrastées de QTL de résistance. Nous avons cherché à identifier des gènes dont l'expression constitutive varie entre les différentes classes de QTL et corrèle avec les niveaux de résistance.

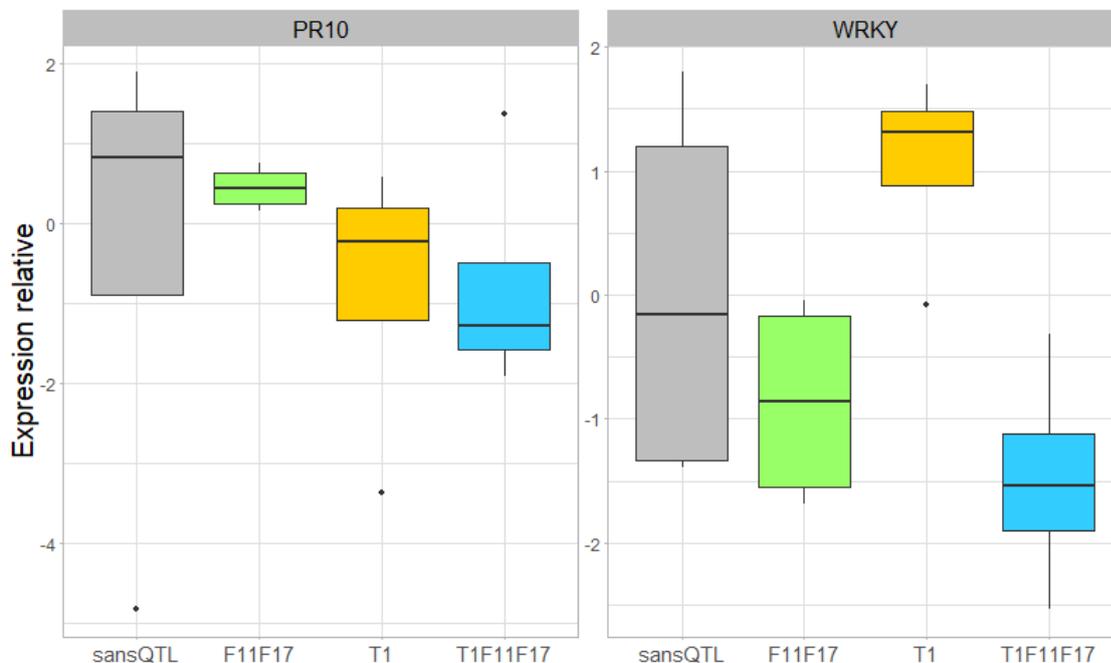


Figure 37 : Expression constitutive relative des gènes PR10 et WRKY en fonction des classes de QTLs.

L'expression constitutive de 12 des 13 gènes de défense étudiés ne varie pas significativement entre les classes de QTL. La **Figure 37** illustre l'expression constitutive des gènes PR10 et WRKY en fonction des classes de QTL. L'expression constitutive de PR10 ne varie pas en fonction des QTL. Les intervalles des boîtes se recouvrent largement et les résultats d'analyse de variance mettent en évidence que les variations inter-classe ne sont pas significatives. Seule, l'expression du gène WRKY varie significativement en fonction des classes de QTL. En effet l'expression constitutive de ce gène est plus importante dans la classe T1 par rapport aux trois

autres classes de QTL. Cependant, les analyses de comparaison par pair montrent que seul le contraste entre T1 et T1F11F17 est significatif. Le contraste entre T1 et T1F11F17 pourrait s'expliquer par une répression du gène WRKY dans les génotypes porteurs des allèles de résistance aux QTLs qF11 et qF17. Mais cette hypothèse ne concorde pas avec les niveaux d'expression de la classe sansQTL. De plus, WRKY est un gène dont l'activité est liée à des activités transcriptionnelles et de signalisation donc une régulation constitutive de l'expression de ce gène paraît inattendue. Donc globalement les défenses constitutives, au moins au niveau des 13 gènes de défense étudiés, ne sont pas significativement modulées par les QTLs de résistance.

b- Métabolites constitutifs différenciellement accumulés dans les classes de QTLs

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances génétiques à l'état constitutif, la stratégie a été d'utiliser une approche de métabolomique sans a priori afin de quantifier un maximum de signaux métaboliques dans les 4 classes de QTL et d'identifier ceux distinguant chaque classe.

Dans cette partie, seuls les résultats de dosage d'une série de prélèvement (2019) sont présentés. Environ 5000 signaux ont été détectés dans l'ensemble des échantillons. Cependant, du fait d'un nombre important de données manquantes, lié à une défaillance du logiciel de retraitement, une part importante des signaux n'a pas pu être exploitée.

L'ACP réalisée sur les signaux des métabolites dans les génotypes des quatre classes de QTL ne met pas en avant de structure selon les classes de QTLs, en tout cas sur le plan principal (Annexe - **Figure S5**). Il semble donc que les QTLs ne sont pas les facteurs impactant le plus le métabolome constitutif.

En complément de l'ACP, nous avons réalisé une analyse différentielle des métabolites accumulés ou réprimés entre les classes de QTLs en comparaison de la classe sans QTL (analyse dite volcano plot), présentée dans la **Figure 38**.

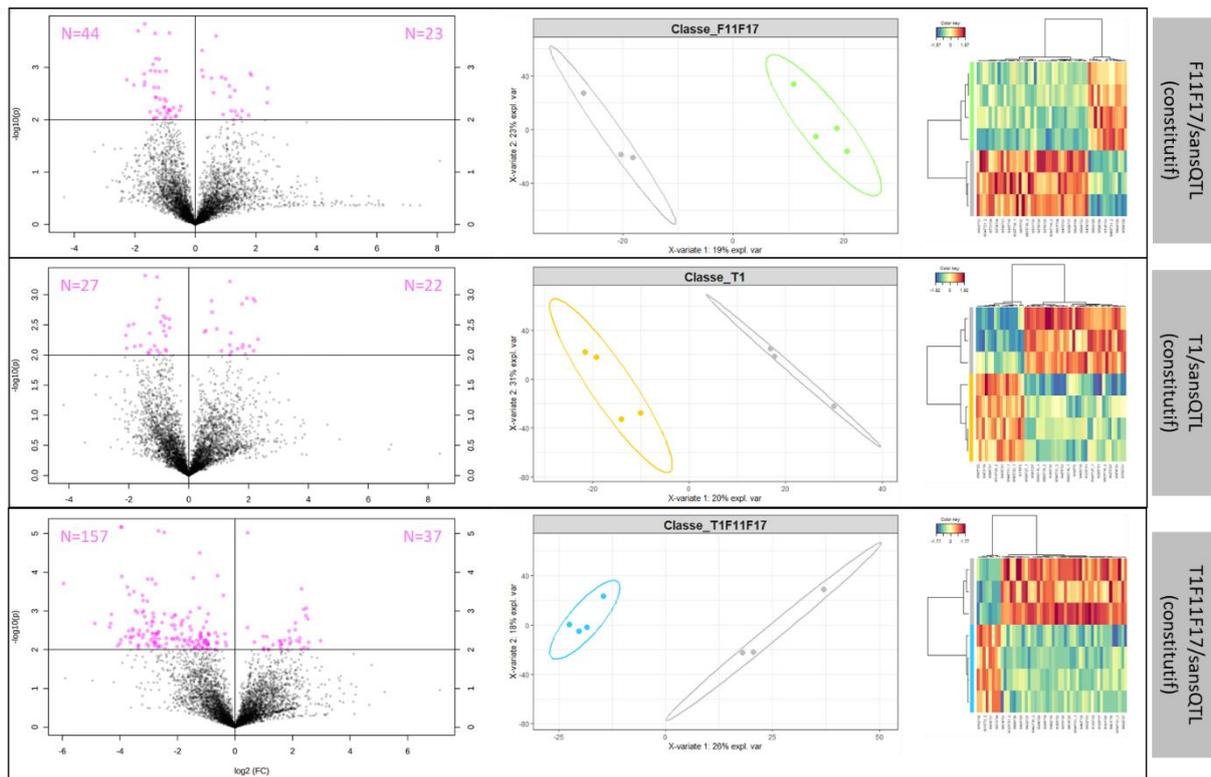


Figure 38 : Volcano plot (Partie gauche), régressions PLS (Partie centrale) de l'accumulation constitutive des signaux métaboliques dans les classes F11F11 (vert), T1 (orange) ou T1F11F17 (bleu) par rapport à la classe sansQTL et heatmap (Partie droite) représentant les intensités des 50 signaux les plus discriminants des différentes comparaisons.

Globalement, plus de signaux (significatifs) sont accumulés dans la classe sansQTL par rapport aux classes de QTL (dans la **Figure 38**, les valeurs de N sont toujours supérieures dans les rectangles haut-gauche que dans les rectangles haut-droit). Ces résultats suggèrent que les QTLs, à l'état constitutif, ont un effet de répression dans plusieurs voies métaboliques. Le contraste entre les classes sansQTL et T1F11F17 est le plus important, avec plus du double de signaux extraits par rapport aux autres comparaisons et un très fort contraste entre signaux sous-accumulés (N=157) et signaux sur-accumulés (N=37). La sur- (et sous-) accumulation reste cependant relativement limitée puisque les valeurs de changement d'intensité d'accumulation ($\log_2(\text{FC})$) significatif ne dépasse que très rarement 2,5 soit un FC égal à 5,65. C'est à nouveau pour le contraste T1F11F17/sansQTL que la sous-accumulation de certains signaux peut atteindre des valeurs de $\log_2(\text{FC})$ inférieures à -4 (soit une accumulation 16 fois moins importantes pour la classe T1F11F17 que pour la classe sans QTL).

L'approche de régression PLS (PLS-DA) consiste à mettre en évidence les signaux contribuant à la différence entre les classes de QTLs et la classe sansQTL. Au lieu de chercher les signaux différentiellement accumulés entre les classes de QTL, cette approche permet d'isoler les signaux qui séparent le plus chaque classe. Les résultats de ces analyses sont présentés dans les parties centrales et à droite de la **Figure 38**. Cette représentation met en évidence le plan qui sépare les génotypes de la classe sansQTL et ceux des classes F11F17, T1 et T1F11F17 et dont la dimension 1 explique 19%, 20% et 26% respectivement de la variabilité des intensités des signaux métaboliques. La plupart des signaux des PLS-DA ont des intensités nettement inférieures dans chaque classe avec QTL par rapport à la classe sansQTL de façon similaire aux résultats décrits dans les volcano plot d'après les résultats des heatmap.

Au final, la combinaison des analyses différentielles et PLS ont permis d'extraire 34 signaux métaboliques dont l'intensité varie en fonction des classes de QTL (**Tableau 16**).

Quatre signaux sont communs aux classes T1 et T1F11F17 et 10 sont spécifiques de chaque contraste. Parmi les signaux identifiés, seulement 11 signaux ont été associés à une voie métabolique, la majorité des signaux est indéterminée. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les bases de données sont incomplètes ou peu caractérisées pour des métabolites spécifiques au pommier. Quatre signaux déterminés sont impliqués dans la voie des acides gras, 5 dans la voie des flavonoïdes et deux dans les voies des biphényles et des coumarines. Les signaux accumulés dans la classe sansQTL et qui contribuent le plus à la variation entre les classes de QTL et la classe sansQTL appartiennent à la voie des flavonoïdes principalement (**Annexe - Tableau S9**).

Tableau 16 : Caractéristiques des 34 signaux métaboliques accumulés constitutivement et de manière la plus significative dans les classes F11F17, T1 et/ou T1F11F17 par rapport à la classe sansQTL.

Signal	Contraste	Volcano plot		PLS	Détermination
		log2(FC)	-log10(pvalue)	Contribution	
M841T30	F11F17/sansQTL	0.68	3.60	-	
M737T33	F11F17/sansQTL	0.22	3.32	0.26	
M738T33	F11F17/sansQTL	0.22	2.95	0.22	
M869T35	F11F17/sansQTL	1.81	2.89	-	
M256T30	F11F17/sansQTL	1.86	2.85	0.21	
M739T33	F11F17/sansQTL	0.25	2.82	0.21	Acide gras
M602T29	F11F17/sansQTL	0.87	2.81	0.21	
M840T30	F11F17/sansQTL	0.53	2.80	-	
M545T31_1	F11F17/sansQTL	1.00	2.78	-	
M281T30_1	F11F17/sansQTL	1.12	2.65	-	Acide gras
M272T30_2	T1/sansQTL	1.38	3.22	-	
M538T29_1	T1/sansQTL	1.95	2.94	-0.27	Acide gras
M573T24	T1/sansQTL	2.21	2.89	-	
M280T30_2	T1/sansQTL	0.78	2.71	-0.24	
M739T24	T1/sansQTL	0.93	2.43	-	
M519T29_2	T1/sansQTL	0.58	2.40	-	
M287T25	T1/sansQTL	0.52	2.38	-	Flavonoïdes
M585T23_1	T1/sansQTL	1.41	2.37	-	Flavonoïdes
M586T23	T1/sansQTL	2.32	2.26	-	Flavonoïdes
M600T28	T1/sansQTL	1.82	2.17	-	
M813T34	T1F11F17/sansQTL	0.44	5.02	-0.38	
M283T30	T1F11F17/sansQTL	2.31	3.57	-	Acide gras
M231T17	T1F11F17/sansQTL	2.48	3.08	-0.23	Biphényle
M271T12	T1F11F17/sansQTL	2.39	3.04	-	
M363T20	T1F11F17/sansQTL	2.47	2.88	-	Flavonoïdes
M463T22	T1F11F17/sansQTL	2.53	2.80	-	
M462T22	T1F11F17/sansQTL	2.10	2.69	-	Coumarines
M814T34_2	T1F11F17/sansQTL	0.43	2.57	-	
M775T21	T1F11F17/sansQTL	2.09	2.52	-	
M476T21	T1F11F17/sansQTL	1.88	2.48	-	
M416T31	T1+T1F11F17/sansQTL	-	-	-	
M885T22	T1+T1F11F17/sansQTL	-	-	-	Flavonoïdes
M886T22	T1+T1F11F17/sansQTL	-	-	-	
M908T22	T1+T1F11F17/sansQTL	-	-	-	

Globalement les contrastes d'intensités des signaux entre les classes de QTLs et la classe sansQTL sont faibles à modérés ($FC < 16$) et la majorité des signaux impliqués dans ces contrastes sont accumulés dans la classe sansQTL (**Figure 38**). Les analyses des échantillons prélevés en 2018 et 2020 confirment les tendances observées (données non présentées). Globalement, les classes de QTLs n'impactent pas fortement le métabolome à l'état constitutif. Les différences sont plutôt spécifiques à certaines voies dont les voies des acides gras et des flavonoïdes (**Tableau 16**).

c- Corrélation entre l'expression constitutive de gène de défense dans CCe_61 et les résistances quantitatives et induites par SDP

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances génétiques et/ou induites par les SDP, l'expression constitutive de 13 gènes de défense a été suivie par RT-qPCR dans une collection de 61 variétés contrastées pour leur sensibilité à *Vi* et *Ea*. Nous avons cherché à identifier des gènes dont l'expression constitutive varie en fonction des variétés et corrèle avec les niveaux de résistance.

L'évaluation par analyse de variance des biais techniques a permis de corriger l'effet d'un lot d'échantillons sur la CCe_32. En effet, les données d'une des copies des génotypes (pourtant sans lien entre elles), dont les résultats divergent des deux autres séries, ont été retirées de l'analyse. Aucun autre effet significatif n'a été mis en évidence.

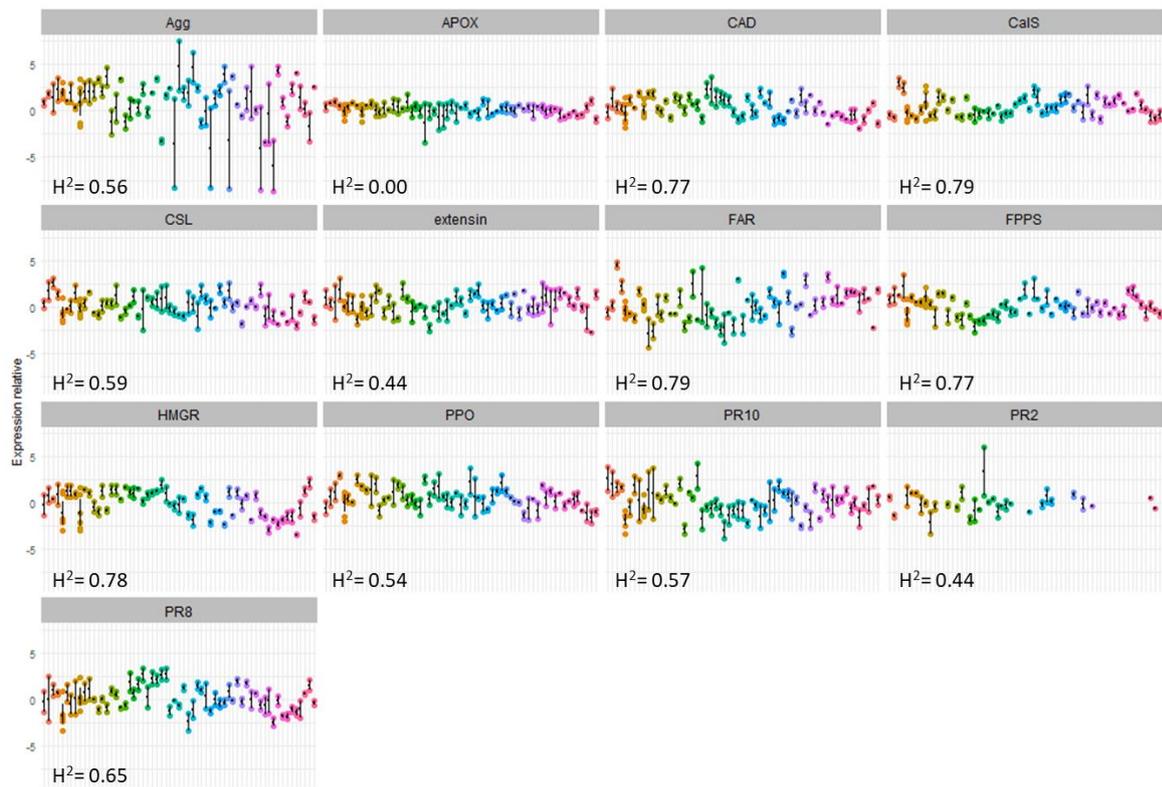


Figure 39 : Expression relative constitutive et répétabilité (H^2) des 13 gènes de défenses dans les 61 variétés de la CCe_61. Chaque colonne représente une variété et chaque point une répétition biologique de la variété.

La **Figure 39** représente la variabilité de l'expression constitutive des 13 gènes étudiés au sein des variétés et les répétabilités correspondantes. La répétabilité (ou héritabilité au sens large) traduit l'ampleur de la variance de l'expression entre les variétés par rapport à l'ensemble de la variance inter- et intra-variété. Les expressions des gènes se divisent selon trois niveaux de variabilité. L'expression constitutive du gène APOX ne varie pas significativement en fonction des variétés ; la répétabilité de ce gène est donc nulle. L'expression constitutive des gènes CAD, CalS, FAR, FPPS et HMGR au contraire varie fortement entre les génotypes avec des répétabilités qui varient de 0,77 pour CAD et FPPS à 0,79 pour CalS et FAR. Et pour finir, la variabilité de l'expression constitutive des gènes Agg, CSL, extensin, PPO, PR10, PR2 et PR8 est intermédiaire avec des valeurs de répétabilité entre 0,44 pour l'extensin et PR2 et 0,65 pour PR8. Les corrélations entre l'expression constitutive des 13 gènes ont été explorées à travers une ACP (Annexe - **Figure S6**). Les résultats de cette analyse indiquent que 31,5% de la variabilité observée dans les 61 variétés est expliquée principalement dans la dimension 1 par

les gènes HMGR, PR8 et CAD (corrélés) et le gène extensin (OLE4, anticorrélé). Les gènes PR10 et PPO contribuent principalement à la dimension 2 qui expliquent 15% de la variabilité.

Globalement la variabilité intra-variété (répétitions biologiques) est faible, excepté pour certains gènes comme Agg. Agg est un gène dont les seuils de CT avoisinent 30, ce qui met en évidence le faible niveau d'expression de ce gène constitutivement. Il est possible que pour certaines répétitions biologiques, la quantité d'ADNc soit légèrement inférieure aux autres et le nombre de transcrits, déjà faible, n'est plus détecté dans ces cas, ce qui génère des niveaux de variabilité 'intra' importants.

Le **Tableau 17** donne les coefficients de corrélation entre l'expression constitutive des 13 gènes dans la CCe_32 ou la CCe_61 et (i) la sensibilité à *Vi* et *Ea* ou (ii) l'efficacité de l'ASM. Une corrélation négative (nuances bleu) entre l'expression et l'AUDPC signifie que plus le niveau d'expression basale du gène est élevé plus la sensibilité de la variété est faible. A l'inverse une corrélation positive (nuances rouge) entre l'expression et l'efficacité de l'ASM signifie que plus le gène est exprimé plus l'efficacité du traitement ASM est importante.

Les résultats de corrélation entre l'expression et la sensibilité (AUDPC) d'une seule des répétitions des tests sont présentés dans cette partie. Pour la CCe_32, les corrélations sont présentées pour les tests Vi-B04_{32_1} et Ea-1430_{32_1}. Pour la CCe_61, les données de sensibilité obtenues avant ma thèse sur la CCe ont été utilisées. Puisque plusieurs séries de tests sont disponibles sur la CCe, les deux séries de données utilisées pour la corrélation (Vi-B04_CCe_2016 et Ea-1430_CCe_2018) ont été choisies selon la disponibilité des données pour les 61 variété et leur qualité. Des analyses de corrélation entre les données de sensibilité des tests Vi-B04_{32_1} et Ea-1430_{32_1} et les différentes séries de données obtenues sur les CCe pour les 32 variétés, ont permis de sélectionner les tests Vi-B04_CCe_2016 et Ea-1430_CCe_2018 (Annexe - **Figure S7**).

Tableau 17 : Coefficients de corrélation de Pearson entre l'expression constitutive relative des 13 gènes de défense étudiés et la sensibilité (AUDPC) à *Vi* (Vi-B04₃₂_1 dans la CCe_32 et Vi-B04_CCe_2016 dans la CCe_61) et à *Ea* (Ea-1430₃₂_1 dans la CCe_32 et Ea-1430_CCe_2018 dans la CCe_61) ou l'efficacité de protection de l'ASM dans la CCe_32. Les seuils de significativité des coefficients de corrélation (à 5%) sont respectivement 0.35 pour CCe_32 et 0.25 pour CCe_61.

			PR2	FAR	APOX	FPPS	HMGR	CSL	Extensin	PR10	PPO	Agg	PR8	CAD	CaIS
CCe_32	Vi-B04 ₃₂ _1	AUDPC	0.02	0.09	-0.04	-0.21	-0.32	-0.34	0.44*	0.01	-0.14	0.36*	-0.24	-0.25	0.25
		Efficacité ASM	-0.08	0.11	-0.07	-0.04	0.18	0.15	-0.19	-0.17	0.07	-0.28	0.30	0.23	0.01
CCe_32	Ea-1430 ₃₂ _1	AUDPC	-0.01	0.01	0.14	0.18	-0.07	-0.13	0.23	-0.32	0.14	-0.04	-0.18	0.14	0.2
		Efficacité ASM	0.26	-0.05	-0.47*	-0.02	-0.08	0.11	-0.15	-0.15	0.12	-0.14	0.31	0.02	-0.07
CCe_61	Vi-B04_CCe_2016	AUDPC	-	0.04	-0.03	0.08	-0.09	-0.18	0.26*	-0.04	-0.1	0.37*	-0.01	-0.07	0.14
CCe_61	Ea-1430_CCe_2018	AUDPC	-	-0.23	-0.01	0	-0.03	-0.07	0.02	-0.16	0.1	0.17	-0.06	0.08	-0.04

Les niveaux de corrélation entre l'expression constitutive des gènes et la sensibilité ou l'efficacité sont compris entre -0,47* (APOX – efficacité ASM/feu bactérien) et 0,44* (extensin – sensibilité/tavelure). Globalement, la plupart des coefficients de corrélation présentent des valeurs non significatives, tant pour la sensibilité que pour l'efficacité du traitement ASM. La variation de l'expression constitutive de la plupart des gènes étudiés n'est donc pas significativement impliquée dans les niveaux de résistance quantitative, ni dans l'efficacité de l'ASM, évalués après inoculation.

Cependant, dans le détail, l'expression constitutive des gènes Extensin et Agg semble varier dans le même sens que la sensibilité à la tavelure quelle que soit la taille de la population étudiée, et ceci de manière significative à chaque fois. Ce résultat, un peu contre-intuitif et opposé à notre hypothèse de départ (un niveau élevé de défense constitutive traduirait un niveau élevé de résistance quantitative après infection), est néanmoins intéressant à considérer et sera discuté plus loin. La corrélation de l'expression de ces deux gènes avec la sensibilité à la tavelure est retrouvée dans la répétition Vi-B04₃₂_2 pour la CCe_32 et dans la plupart des autres tests phénotypiques disponibles pour la CCe même si les valeurs de corrélation sont plus faibles (Annexe - **Tableau S10**). Concernant le gène APOX, la corrélation significative de -0,47 avec l'efficacité de l'ASM vis-à-vis du feu bactérien pour la CCe_32 ne semble pas pertinente à considérer vu l'absence de variabilité significative de l'expression de ce gène sur la CCe_61 ($H^2 \sim 0$).

Le coefficient de corrélation est d'ailleurs quasi-nul (-0.01) pour CCe-61 (**Tableau 17**). Pour tous les autres gènes les tendances de corrélation sont faibles et souvent non répétables entre les données de la CCe_32 et la CCe_61. A noter cependant, les corrélations positives et presque significatives à 5% (0,30 et 0,31 pour tavelure et feu bactérien, respectivement) pour le gène PR8 pour l'efficacité de l'ASM dans la CCe_32, mais ce résultat n'est pas confirmé avec la CCe_61.

Les gènes PR10, Agg et PPO ont été sélectionnés pour une étude approfondie de leur niveau d'expression constitutive dans la CCe sur 347 variétés. Ces gènes ont été choisis pour la variabilité de leur expression constitutive et leur rôle dans les défenses contre *Vi* et/ou *Ea* et/ou leur induction après application d'ASM sur la base de résultats obtenus par ailleurs dans l'équipe Respom. Hormis pour Agg, le choix de ces gènes n'a donc pas pris en compte les

niveaux de corrélation avec les résistances ci-dessus comme initialement prévu du fait des faibles niveaux de corrélation généralement observés.

d- Corrélation entre l'expression constitutive de gène de défense et les résistances quantitatives dans la CcE et détection de QTLs d'expression

Afin d'identifier les facteurs génétiques impliqués dans la variabilité des défenses constitutives, l'expression constitutive des gènes PR10, Agg et PPO a été étudiée par RT-qPCR sur ~400 variétés de pommier. Les biais techniques, liés aux différences entre les dates de prélèvement des échantillons, ont été évalués par analyse de variance et ajustés. L'évaluation de la corrélation expression/résistance a d'abord été faite. Une analyse de génétique d'association a ensuite été réalisée à partir de ces données pour tenter de mettre en évidence des QTLs d'expression, ou eQTLs.

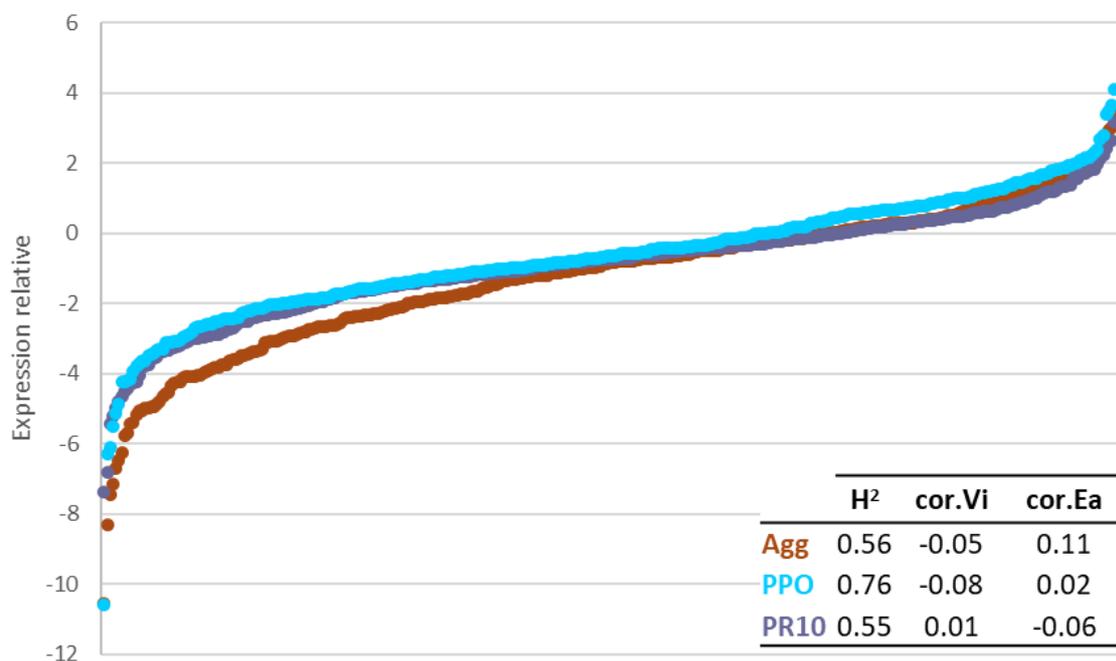


Figure 40 : Expressions relatives constitutives moyennes (classées par ordre croissant en abscisse) des 3 gènes de défenses Agg, PPO et PR10, répétabilités (H^2) et coefficients de corrélation de Pearson entre l'expression et la sensibilité à *Vi* (cor.Vi, Vi-B04_CcE_2016) et *Ea* (cor.Ea, Ea-1430_CcE_2018) dans les 400 variétés de la CcE.

La **Figure 40** représente la variabilité de l'expression relative constitutive et le tableau présent dans la même figure résume l'héritabilité et les coefficients de corrélation avec la sensibilité à *Vi* et *Ea* des gènes étudiés. L'expression relative constitutive des gènes PR10, Agg et PPO varie entre -11 et 4 avec une gamme de variation similaire pour les 3 gènes. L'héritabilité du gène PPO (0,76) est nettement supérieure à celles des gènes Agg (0,56) et PR10 (0,55), à la différence du calcul précédent pour la CCe_61 où les trois héritabilités étaient très voisines. L'absence de corrélation observée entre les défenses constitutives et la sensibilité à *Vi* et *Ea* sur les 61 variétés de la CCe_61 est confirmée sur les ~400 variétés avec des corrélations qui varient entre -0,08 et 0,11. Seule cette dernière valeur obtenue pour l'expression d'Agg corrélée au niveau de résistance au feu bactérien est tout juste significative (p -value = 0,049).

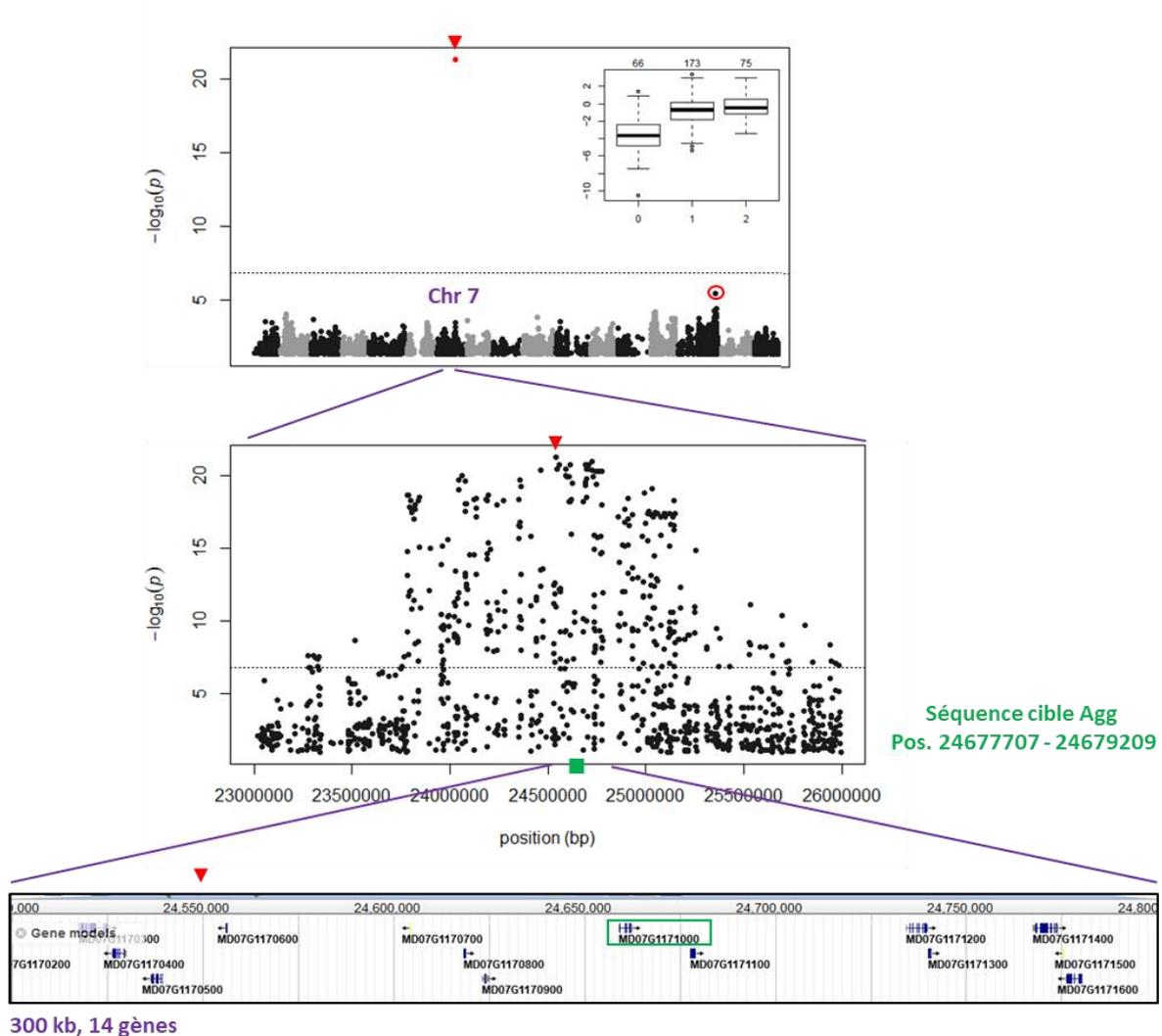


Figure 41 : Résultats de détection par GWAS (Manhattan plot) de deux QTLs d'expression du gène Agg (SNP significatif représenté par un point rouge et second SNP entouré en rouge) et localisation physique du SNP significatif à proximité de la séquence cible.

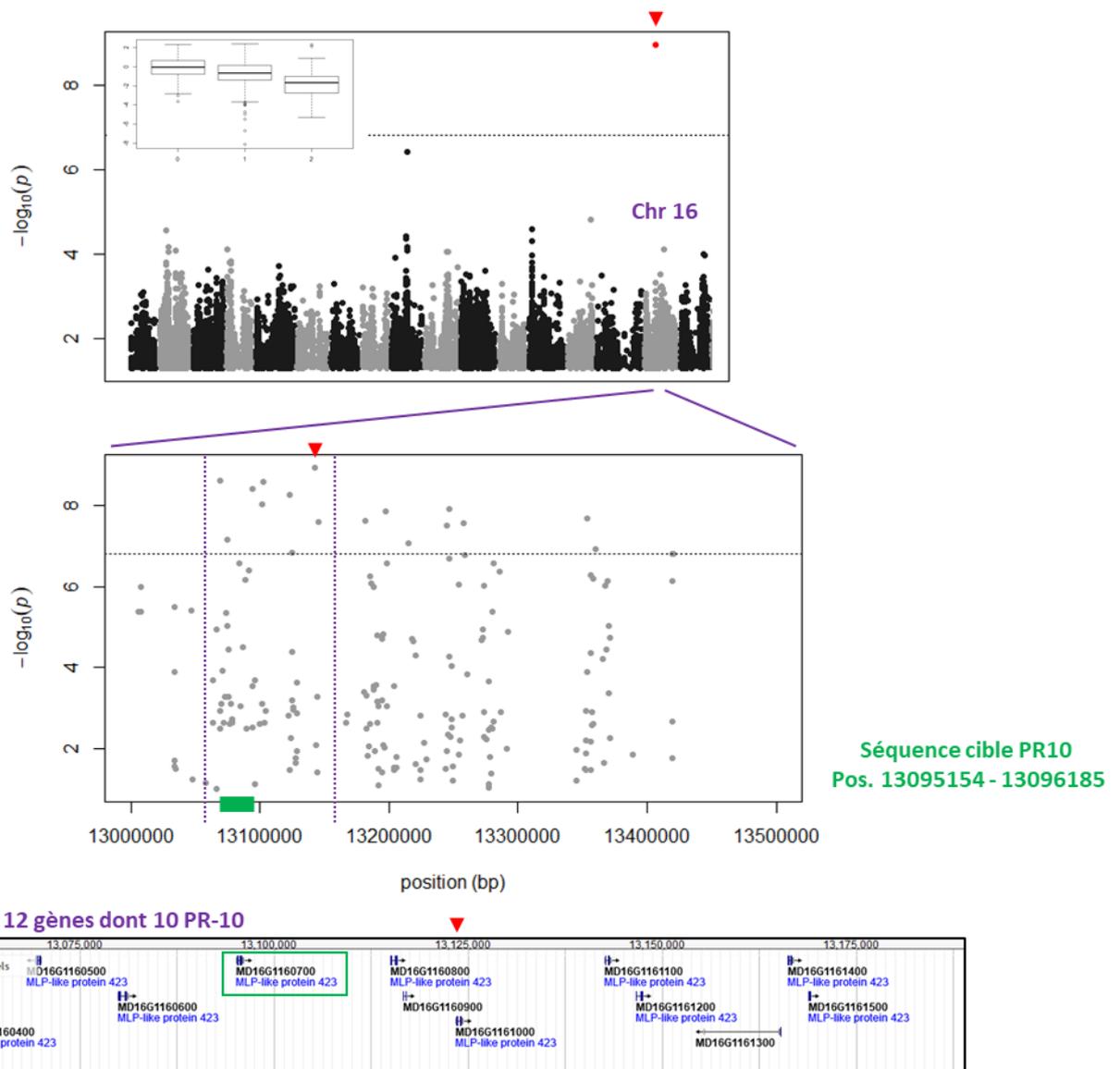


Figure 42 : Résultats de détection par GWAS (Manhattan plot) d'un QTL d'expression du gène PR10 et localisation physique du SNP significatif à proximité de la séquence cible.

La GWAS a été réalisée sur les moyennes génotypiques, extraites des analyses de variance (Expression $\sim \mu + \text{Génotype} + e$). Les modèles de GWAS, sélectionnés à partir du critère de qualité eBIC ont permis de révéler 2 SNPs significatifs.

Un SNP (AX-115311000) de pvalue très élevée (>20) est associé à la variation de l'expression constitutive du gène Agg. Ce SNP de polymorphisme C/T est situé sur le chromosome 7 à proximité (~ 137 kb) du début de la séquence du gène ciblé en qPCR. Sa contribution à la variation totale de l'expression est de 25%. Il semble présenter un mode d'action dominant

au vu des valeurs moyennes par classe génotypique présentées dans l'encart de la **Figure 41** où les classes 1 et 2 (doses d'allèle T) présentent une valeur moyenne quasi-identique, alors que la classe 0 présente une valeur très nettement inférieure (-0,7 et -0,4 contre -3,7, respectivement). L'effet du passage de 0 dose à 1-2 dose(s) d'allèle T entraîne un surplus d'expression relative du gène Agg de l'ordre de 3,2 (en valeur $\log(2^{-\Delta\Delta Cq})$), ce qui représente $\sim 1,6$ écart-type des moyennes génotypiques analysées. Vue sa position physique, ce eQTL est très probablement impliqué dans une régulation en cis de l'expression du gène Agg, vraisemblablement liée à une variation de séquence au niveau du promoteur du gène. Les analyses réalisées avec d'autres modèles de GWAS ont permis de révéler un autre SNP associé à l'expression du gène Agg (entouré en rouge dans la **Figure 42** et détaillé en Annexe - **Figure S8**). Ce SNP présente une valeur de pvalue inférieure au seuil de significativité calculé mais se distingue du bruit de fond des autres SNPs. Ce SNP est situé sur le bas du chromosome 15, à 73b du début du gène annoté comme ABA Overly-sensitive 5. Vue sa position, ce eQTL assurerait une régulation en trans du niveau d'expression d'Agg. La contribution cumulée à la variation d'expression du gène Agg des deux SNPs est de l'ordre de 31%.

Pour le gène PR10, un SNP (AX-115610407) est aussi associé à son niveau d'expression avec une pvalue élevée de ~ 9 . Ce SNP de polymorphisme T/C est localisé sur le chromosome 16, également à proximité (~ 47 kb) de la fin de la séquence cible du gène étudié et dans la séquence d'une autre séquence de la même famille de gène. Plus généralement, le SNP se situe au milieu d'une famille multigénique de 14 gènes PR10 qui s'étend sur 212kb. Sa contribution à la variation totale de l'expression est de 11%. Il semble présenter un mode d'action additif au vu des valeurs moyennes par classe génotypique présentées dans l'encart de la **Figure 42** où les classes 0, 1 et 2 (doses d'allèle C) présentent un échelonnement de valeurs moyennes plus progressif que dans le cas précédent. L'effet du passage de 0 à 2 doses d'allèle C entraîne une réduction d'expression relative du gène PR10 de l'ordre de -1,6 (en valeur en valeur $\log(2^{-\Delta\Delta Cq})$), ce qui représente ~ 1 écart-type des moyennes génotypiques analysées. Vu sa position physique, ce eQTL est à nouveau très probablement impliqué dans une régulation en cis de l'expression d'un ou plusieurs gènes PR10 situés à proximité.

Enfin, aucun SNP significatif n'a été identifié selon le modèle eBIC pour la variation de l'expression constitutive du gène PPO, mais les analyses réalisées avec d'autres modèles ont permis de révéler trois SNPs associés à cette variation (Annexe - **Figure S9**). Ces SNPs sont

situés sur les chromosomes 2 (AX-115496694), 3 (AX-115415906) et 17 (AX-115387992). Leur contribution à la variation totale de l'expression du gène est de 19% avec 8%, 5% et 6%, apporté par les SNPs des chromosomes 2, 3 et 17 respectivement. Ils semblent tous trois présenter un mode d'action additif, excepté le SNPs du chromosome 3 mais pour lequel les effectifs sont déséquilibrés. Le SNP AX-115496694 du chromosome 2 colocalise avec un gène annoté comme une protéine de la famille des phosphoribosyltransferase, le SNP AX-115415906 présent sur le chromosome 3 colocalise avec un facteur de transcription MYB102 et le SNP AX-115387992 présent sur le chromosome 17 colocalise avec un facteur de régulation de l'épissage des ARNm. Aucun SNP situé au voisinage du gène PPO ciblé localisé sur le chromosome 10 ne s'est révélé significatif. La variation de l'expression de ce gène semble donc principalement provenir d'une régulation en trans.

3- Quelles sont les défenses induites impliquées dans l'efficacité des résistances génétiques et/ou des traitements SDP ?

a- Variabilité du niveau d'expression induite de gène de défense dans les classes de QTLs

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances génétiques et/ou induites par les SDP, l'expression induite de 13 gènes de défense a été suivie par RT-qPCR dans les génotypes de 4 classes contrastées de QTLs de résistance à la tavelure, après un traitement à l'eau ou à l'ASM et sur 3 temps avant (J0) et après l'infection (J3 et J5) par *Vi*. Nous avons cherché à identifier les gènes dont l'expression varie significativement en fonction des classes de QTL, du traitement et/ou de l'infection. Le critère retenu a été de détecter au moins un facteur significatif dans les analyses de variance réalisées sur les données d'expression disponibles. L'objectif est d'identifier les facteurs qui expliqueraient l'interaction entre les résistances génétiques et induites par les SDP.

La **Figure 43** illustre l'expression des 10 gènes induits significativement par le traitement à l'ASM à J0 ou par l'infection dans la condition témoin (Eau), en fonction des classes de QTL. A J0, le traitement à l'ASM induit l'expression des gènes HMGR et PR10 et réprime le gène CAD, ce dernier étant globalement plus exprimé dans la condition témoin au temps J0. Ces

tendances sont retrouvées après l'infection également. Pour ces trois gènes, l'effet d'interaction entre le traitement et la classe de QTL n'est pas significatif dans l'analyse de variance. Donc l'expression des trois gènes est induite par l'ASM quelle que soit la classe de QTL. Cependant si on compare les données d'expression au temps J0 par exemple, le contraste d'expression entre la condition témoin et le traitement ASM semble plus important au sein des génotypes de la classe sansQTL pour CAD et de la classe F11F17 pour PR10. De même, le contraste d'expression entre la condition témoin et le traitement à l'ASM semble absent voire inversé dans la classe F11F17 pour le gène CAD et la classe sansQTL pour le gène HMGR (**Figure 43** et Annexe - **Figure S10**). Quatre génotypes par classe et par traitement sont testés ce qui peut être insuffisant pour faire ressortir un faible effet significatif de l'interaction SDPxclasse. L'ASM ne semble pas avoir d'effet potentialisateur sur l'expression des gènes étudiés car l'effet de l'ASM avant l'infection (J0) est comparable à son effet après l'infection (J3 et J5).

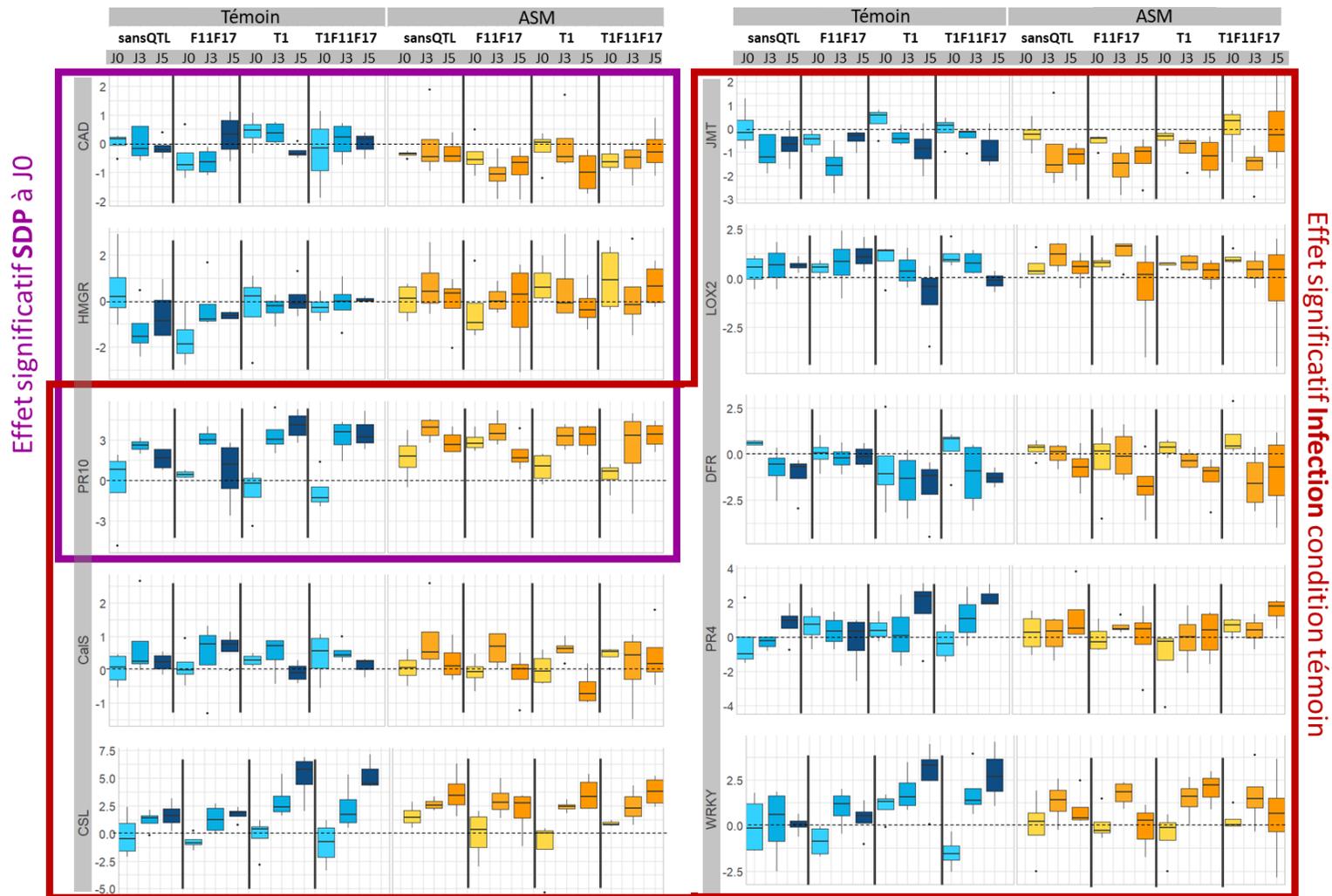


Figure 43 : Expressions relatives des 10 gènes de défense induits significativement par l'ASM (encadré violet) ou par l'infection par Vi (encadré rouge) en fonction des classes de QTLs. Les traitements sont représentés en bleu pour l'eau et orange pour l'ASM et la cinétique de prélèvements après infection (J0, J3, J5) est représentée par le dégradé de bleu clair à bleu foncé ou de jaune à orange foncé.

L'infection (comparaison J0/J3/J5) modifie significativement l'expression des gènes CalS, CSL, DFR, JMT, LOX2, PR10, PR4 et WRKY dans la condition témoin. Les gènes CalS, CSL, PR10, PR4 et WRKY sont surexprimés après l'infection à J3 et/ou J5. Parmi ces gènes, l'expression de CSL, PR10 et WRKY est plus importante et maintenue sans différence significative entre J3 et J5 tandis que CalS n'est surexprimé qu'au temps J3 et PR4 au temps J5. Les gènes JMT, LOX2 et DFR sont réprimés après l'inoculation, à J3 et J5 pour JMT et DFR et à J5 seulement pour LOX2. L'effet de l'infection est retrouvé après traitement à l'ASM mais les contrastes sont moins importants que dans la condition témoin. C'est le cas notamment pour les gènes PR10, CSL et WRKY pour lesquels le contraste J0/J3/J5 est très important en condition témoin et nettement amoindri en condition ASM (ex : expression de CSL dans la classe T1F11F17).

L'expression de WRKY varie significativement au sein des différentes classes de QTL, plus particulièrement entre les classes plus résistantes portant qT1 (T1 et T1F11F17) et les classes plus sensibles ne le portant pas (sansQTL et F11F17). Cependant l'interaction InfectionxQTL n'est pas significative sans doute par manque de puissance statistique du test (trop peu de degré de liberté). Malgré les résultats d'analyse de variance non significatifs pour les interactions entre l'infection et les classes de QTL, il semblerait que l'expression des gènes CSL, DFR, JMT, LOX2, PR10, PR4 et WRKY soit modulée différemment en fonction des combinaisons d'infection et de classe de QTL. En effet, l'impact de l'infection semble exacerbé dans les classes T1 et T1F11F17 pour les gènes CSL, JMT, LOX2, PR10 et PR4 et dans les classes sansQTL et T1F11F17 pour le gène DFR. De plus, dans les génotypes de la classe F11F17 les contrastes d'expression liés à l'infection sont réduits et les tendances sont souvent inversées par rapport aux autres classes de QTL.

Donc l'expression d'une partie des gènes étudiés varie en fonction du traitement ASM et de l'infection avec un effet de l'infection qui impacte un plus grand nombre de gènes. Les effets de l'ASM et de l'infection sur l'expression de ces gènes semblent dépendre de la classe de QTL même si les résultats des analyses statistiques ne permettent pas de confirmer cette hypothèse. Il est intéressant de voir que les gènes CSL, WRKY, PR4 et PR10 associés à une signalisation SA sont activés dans les classes T1 et T1F11F17 alors que les gènes associés à une régulation JA (JMT, LOX, DFR) sont plutôt réprimés. La co-régulation des voies SA et JA est bien connue et indique dans ces résultats que le QTL T1 semble déclencher une signalisation SA ou intervenir dans une voie de défense commune aux voies régulées par SA. Au contraire, au sein

des gènes étudiés et dans les géotypes de la classe F11F17, ce contraste disparaît. Les QTLs F11 et F17 interviennent probablement en aval d'une signalisation SA ou JA ou indépendamment de ces voies.

b- Métabolites différenciellement accumulés après induction dans les classes de QTLs

Signature métabolique associée aux différents SDP

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances induites par différents SDP, l'accumulation des métabolites secondaires a été dosée par LC-MS dans les géotypes de 4 classes contrastées de QTL de résistance avant infection (échantillons 2018). Seules les classes sansQTL, F11F17 et T1F11F17 seront comparées dans ce paragraphe car les échantillons de la classe T1 n'ont pas pu être exploités dans les prélèvements réalisés en 2018. Nous avons cherché à identifier des empreintes métaboliques spécifiques aux différents SDP et explorer leurs évolutions dans les différentes classes de QTL.

Les résultats d'ACP mettent en évidence une structure entre les échantillons liée à la nature du traitement SDP. Trois groupes ont été isolés correspondant respectivement au traitement eau, au traitement ASM et le dernier groupe composé du Kendal et du PhP. Ces groupes ne reflètent pas l'efficacité respective de ces traitements. Selon leur efficacité (Cf. chapitre III 1.b.), deux groupes pourraient être considérés : un premier composé de l'eau et du Kendal et le deuxième de l'ASM et du PhP. La **Figure 44** illustre un exemple de profil de PLS-DA obtenu pour la classe T1F11F17 (Annexe – **Figure S11**). Les PLS-DA réalisées sur chaque classe de QTL permettent d'isoler les trois mêmes groupes, voire seulement deux réunissant l'eau et l'ASM dans un même groupe dans la classe T1F11F17, selon la dimension 1 expliquant 32% de la variation dans la classe sansQTL, 33% dans la classe F11F17 et 34% dans la classe T1F11F17.

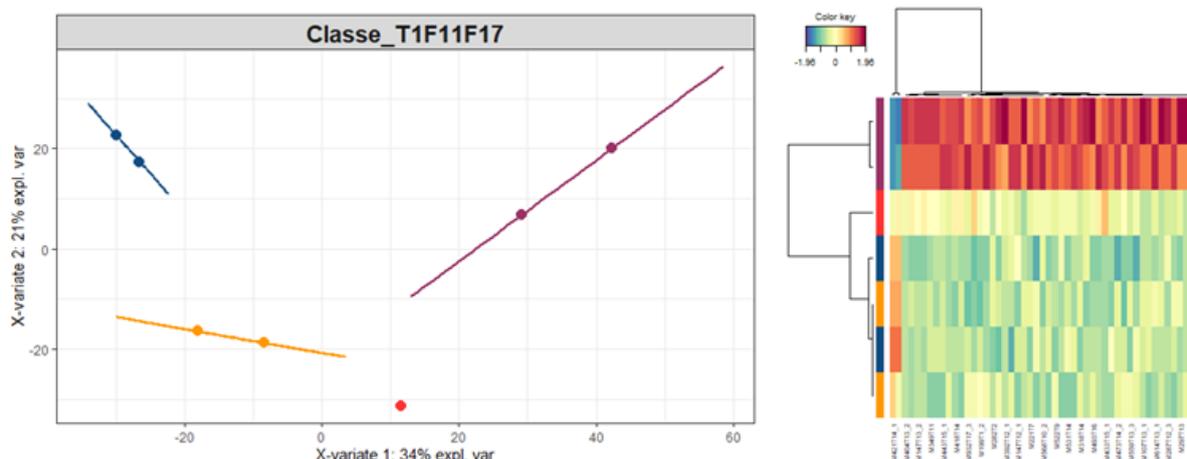


Figure 44 : Régressions PLS de l'accumulation constitutive des signaux métaboliques en fonction des traitements représentés en bleu pour la condition témoin, en orange pour le traitement ASM, en rouge pour le PhP et en violet pour le Kendal dans la classe T1F11F17 (échantillons prélevés en 2018) et heatmap représentant les intensités des 50 signaux les plus discriminants de la comparaison.

Etonnamment, les métabolites contribuant à cette structuration sont majoritairement accumulés après le traitement à l'eau (**Partie B de la Figure 44**). En l'absence d'infection, les traitements SDP ont des effets plutôt répressifs sur le métabolome. Le contraste le plus fort est observé entre le traitement eau et les traitements PhP et Kendal.

Par une approche de sPLS-DA, les listes de signaux contribuant (contribution > 15%) à séparer l'eau et l'ASM et ceux à séparer l'eau et le PhP ont été extraits dans chaque classe de QTL (sansQTL, F11F17 et T1F11F17). Entre 17 et 21 signaux ont été isolés par classe. Parmi ces signaux, 17 sont communs à la séparation des traitements ASM et PhP de l'eau (**Tableau 18**), 41 sont spécifiques de la signature ASM et 41 de la signature PhP (Annexe - **Tableau S11**). Seulement 2 signaux sont communs à deux classes de QTLs pour la comparaison des traitements avec la condition témoin. Les déterminations des signaux identifiés n'ont encore été réalisées.

Tableau 18 : Liste des signaux métaboliques identifiés par régression PLS dans la comparaison entre les traitements (ASM et PHP) et la condition témoin (Eau) et commun aux deux comparaisons dans les classes de QTLs (sansQTL, F11F17 et T1F11F17).

Signal	ASM/Eau			PHP/Eau			Total
	sansQTL	F11F17	T1F11F17	sansQTL	F11F17	T1F11F17	
M382T1_1			1			1	2
M580T10_2			1			1	2
M641T2			1			1	2
M923T11_5			1			1	2
M723T14_3			1	1			2
M231T14	1	1		1			3
M298T7	1			1			2
M341T1_1	1			1			2
M348T16	1			1			2
M349T16_2	1			1			2
M479T12_1	1			1			2
M862T16	1			1			2
M175T1_3		1		1			2
M164T20		1			1		2
M345T19		1			1		2
M475T11_3		1			1		2
M475T19		1			1		2

En fonction des classes de QTL, les réponses métaboliques aux traitements SDP semblent varier. Malgré la divergence de nature des SDP étudiés, des effets communs sur le métabolisme semblent identifiés. La caractérisation des voies modulées par l'application d'ASM est détaillée dans le paragraphe suivant.

Modulation du métabolome en fonction des résistances génétiques et/ou induites par ASM

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances génétiques et/ou induites par l'ASM et ou l'infection par *Vi*, l'accumulation des métabolites a été dosée par LC-MS dans les géotypes de 4 classes contrastées de QTL de résistance deux jours après traitement (J0) et 3 jours après inoculation (J3). Dans cette partie, seuls les résultats de dosage d'une série de prélèvement (2019) sont présentés au temps J0 et J3 et dans les quatre classes de QTLs.

Une première ACP (Annexe - **Figure S12**) a été réalisée sur les échantillons prélevés à J0 dans les classes de QTLs pour étudier l'effet du traitement ASM sur le métabolome. Aucune structuration liée au traitement n'est observable. La structuration des échantillons est principalement liée aux génotypes. Trois groupes de génotypes sont mis en évidence selon la dimension 1 de l'ACP : ils sont composés des génotypes F117 (T1), F244 (T1), F336 (F11F17), F081 (T1F11F17) et F259 (T1F11F17) pour le premier groupe (coordonnée x entre -16 à -42), des génotypes F193 (sansQTL), F233 (sansQTL) et F171 (F11F17) pour le deuxième groupe (coordonnées x~0) et des génotypes F025 (sansQTL), F064 (T1), F207 (T1), F135 (F11F17), F139 (F11F17), F072 (T1F11F17) et F073 (T1F11F17) pour le troisième groupe (coordonnée x entre 11 et 32). Les classes de QTLs ne semblent donc absolument pas structurer ces trois groupes de génotypes.

Une deuxième ACP (**Figure 45**) a été réalisée sur les échantillons de la condition témoin dans les classes de QTL pour étudier l'effet de l'infection (comparaison des temps J0 et J3) sur le métabolome. L'ACP est à nouveau structurée principalement par les génotypes pour la dimension 1. La dimension 2 de l'ACP semble séparer la classe T1F11F17 des autres classes et à l'échelle de chaque génotype, la dimension 2 sépare également le temps de prélèvement. En effet pour chaque génotype, l'échantillon prélevé 3 jours après infection a des coordonnées supérieures en y par rapport à l'échantillon prélevé à J0. Cependant cette structuration est relativement faible.

Une troisième ACP (Annexe - **Figure S13**) a été réalisée sur les échantillons traités à l'eau ou à l'ASM, à J0 ou J3 pour étudier l'effet de la combinaison entre le traitement et les résistances induites par l'infection dans les classes de QTL. De façon similaire aux précédents résultats, l'ACP est structurée globalement par les génotypes. La comparaison des coordonnées moyennes suggère une séparation des classes SansQTL et F11F17 vers le bas et les classes T1 et T1F11F17 vers le haut mais les nuages de points se recouvrent. Aucune structuration liée au traitement ou à l'infection n'apparaît de façon évidente. Ces résultats suggèrent que l'ASM et/ou l'infection ne modifie pas ou peu le métabolome des génotypes étudiés ici. L'ASM et/ou l'infection ne modulent certainement qu'une partie du métabolome accessible dans notre étude.

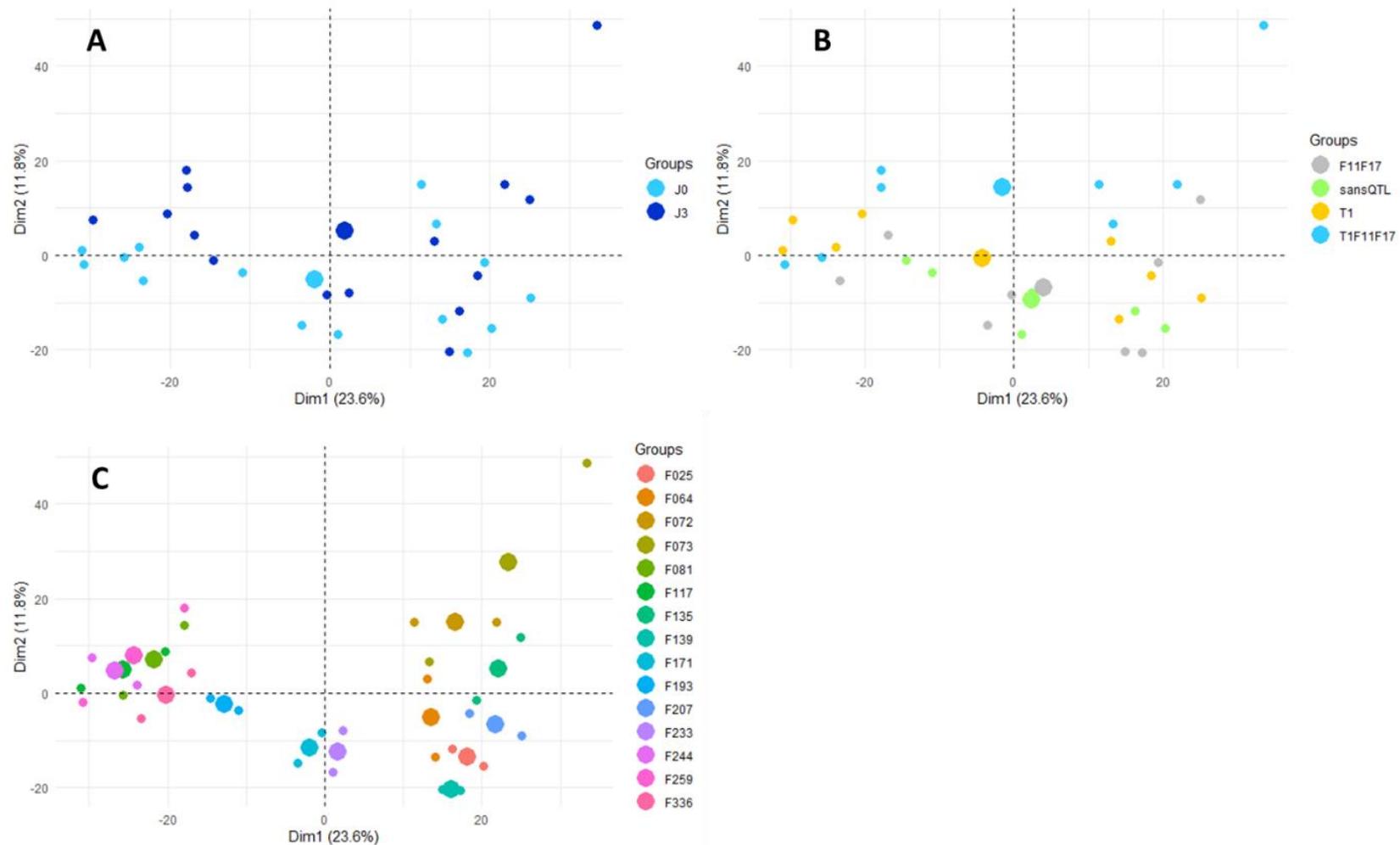


Figure 45 : ACP réalisée sur les échantillons de la condition témoin dans les classes de QTL pour étudier l'effet de l'infection (comparaison des temps J0 et J3) sur le métabolome. Des filtres de couleurs sont appliqués pour évaluer les facteurs qui influencent la structuration de l'ACP avec : A – la variable d'infection (J0 en bleu clair, J3 en bleu foncé), B- les classes de QTLs (sansQTL en vert, F11F17 en gris, T1 en orange et T1F11F17 en bleu) et C- les génotypes.

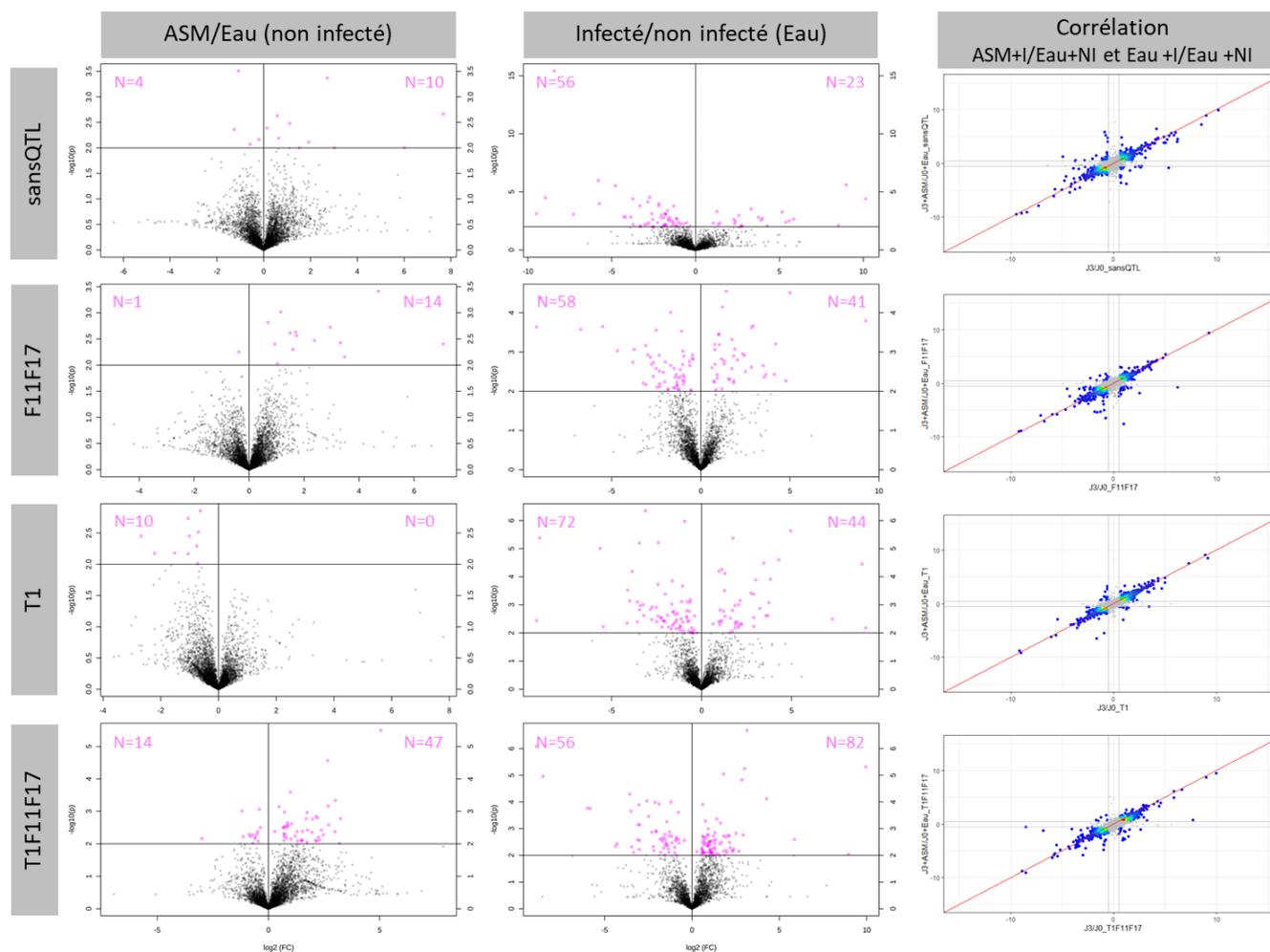


Figure 46 : (Partie gauche) Volcano plot des contrastes d'accumulation des signaux métaboliques entre la condition témoin et le traitement ASM avant l'infection (ASM/Eau (non infecté)) et entre la condition infectée et non infectée dans la condition témoin (Infecté / non infecté (Eau)) dans les classes sansQTL, F11F17, T1 et T1F11F17. (Partie droite) Corrélation entre les contrastes d'accumulation des signaux après traitement à l'ASM et l'infection et dans la condition témoin avant l'infection (ASM+I/Eau+NI) et les contrastes d'accumulation des signaux entre la condition infectée et non infectée (I/NI) dans les quatre classes de QTL.

Afin de mettre en évidence les voies impactées par l'ASM et/ou l'infection, les contrastes d'intensité des signaux ont été comparés, dans chaque classe de QTL, (i) entre l'eau et l'ASM en l'absence d'infection (ASM/Eau), (ii) avant et après infection dans la condition témoin (Infecté/non infecté) et (iii) entre les échantillons non induits (condition témoin et non infectés) et les échantillons induits par la combinaison du traitement à l'ASM et de l'infection. La **Figure 46** résume les résultats de ces comparaisons. Puisque les approches par volcano plot et par PLS permettent d'isoler les mêmes signaux (cf résultats partie V-2-b), seuls les résultats des volcano plot sont présentés dans cette partie.

Nous constatons qu'il y a peu de signaux significativement impactés par le traitement à l'ASM avant l'infection pour 3 des 4 classes de QTLs. Moins de 15 signaux sont identifiés comme réprimés ou accumulés dans les classes sansQTL, F11F17 et T1 et 61 le sont dans la classe T1F11F17 pour les paramètres choisis. Parmi les signaux identifiés, M211T22, M212T22 et M213T22 correspondent à la molécule de l'ASM et ses isotopes naturels. Ces composés sont identifiés dans les classes sansQTL et F11F17 uniquement mais le contraste d'intensité des ces signaux entre la condition témoin et le traitement ASM suit la même tendance dans les classes T1 et T1F11F17 malgré le fait qu'il soit en dessous du seuil de significativité (Annexe - **Tableau S12**). Parmi les autres composés déterminées (12 déterminations sur 66 signaux extraits), 4 sont associés à la voie des flavonoïdes, 3 à la voie des acides gras, 2 à la voie de l'acide gallique, 2 à la voie de l'acide phtalique et le dernier à la voie des chlorines (**Tableau 19**). L'acide phtalique est une molécule détectée plutôt dans les racines du pommier (Bai et al., 2009) mais elle est également associée à des composants plastiques (Fujii et al., 2003). Nous ne pouvons pas affirmer que la molécule identifiée est réellement présente dans les feuilles et ne provient pas de contaminations par les contenants donc nous avons choisi d'écarter cette famille des conclusions de cette partie. Dans la classe T1F11F17, 47 signaux sont accumulés dont des métabolites liés aux voies de l'acide gallique, des acides gras et des flavonoïdes. L'accumulation d'un plus grand nombre de signaux dans la classe T1F11F17 peut s'expliquer par le fait que chaque QTL peut interagir différemment avec l'ASM et donc module des voies produisant différents métabolites qui sont donc accumulés dans les géotypes qui cumulent les trois QTLs.

Tableau 19 : Caractéristiques des signaux métaboliques déterminées et plus accumulés après un traitement à l'ASM que dans la condition témoin dans les classes sansQTL, F11F17, T1 et T1F11F17.

Signal	Classe	log2(FC)	-LOG10(p)	Détermination
M599T16	sansQTL	0.14	2.39	Flavonoïdes
M329T10	F11F17	4.70	3.41	Acide gallique (Acide phénolique)
M469T17	F11F17	0.69	2.82	Flavonoïdes ?
M167T12	F11F17	1.49	2.61	Acide phtalique
M314T19	F11F17	0.93	2.40	Flavonoïdes
M329T10	T1F11F17	5.05	5.50	Acide gallique (Acide phénolique)
M542T29	T1F11F17	1.70	2.77	Acides gras
M607T33_1	T1F11F17	0.70	2.11	Chlorines
M167T12	T1F11F17	1.98	2.76	Acide phtalique
M478T17_2	T1F11F17	2.21	2.80	Flavonoïdes
M684T31_2	T1F11F17	3.01	3.34	Acides gras
M925T31	T1F11F17	2.68	3.16	Acides gras

L'infection induit un effet plus important sur le métabolome étudié dans l'ensemble des classes de QTL avec un bon équilibre entre les métabolites accumulés ou réprimés (**Figure 46**). La classe sansQTL semble un peu moins affectée que les autres classes. Au total, 190 signaux accumulés dans les classes de QTLs après l'infection ont été extraits. Parmi les métabolites accumulés dans les classes de QTLs, 7 sont communs aux 4 classes de QTL, 5 sont communs à 3 des classes de QTLs et 19 sont communs à deux des classes. Au sein des signaux restants, 7 sont spécifiques à la classe sansQTL, 17 à la classe F11F17, 20 à la classe T1 et enfin 65 à la classe T1F11F17 (Annexe - **Figure S14**). Les 10 signaux les plus significatifs, spécifiques aux classes de QTLs et commun aux 4 classes de QTL ont été analysés pour identifier les voies métaboliques induites par l'infection, soit 44 signaux au total (10 spécifiques par classes de QTL et 4 communs). Les métabolites déterminés (14/44) sont impliqués dans les voies des acides gras, des flavonoïdes, des chlorines, des composées phénoliques glycosylés et des terpénoïdes (**Tableaux 20**).

Tableau 20 : Caractéristiques des signaux métaboliques déterminés et plus accumulés après une infection dans les classes sansQTL, F11F17, T1 et/ou T1F11F17.

Signal	Classe	log ₂ (FC)	-LOG ₁₀ (p)	Détermination
M281T31	sansQTL	2.59	2.98	Acide gras
M540T29_1	sansQTL	2.70	2.01	Acide gras
M474T33	F11F17	1.16	2.82	Acide gras
M762T28_2	F11F17	3.50	2.65	Composés phénoliques glycosylés
M761T28_2	F11F17	2.84	2.61	Composés phénoliques glycosylés
M803T35_1	T1	3.74	3.08	Acide gras
M845T30_1	T1	2.05	3.00	Terpénoïdes
M638T31_1	T1F11F17	4.28	4.12	Chlorines
M107T19_2	T1F11F17	1.42	3.37	Flavonoïdes
M607T33_1	T1F11F17	0.94	2.78	Chlorines
M107T19_3	commun	-	-	Flavonoïdes
M295T19_2	commun	-	-	Flavonoïdes
M477T17_2	commun	-	-	Flavonoïdes
M607T33_3	commun	-	-	Chlorines

Les contrastes (log₂(FC)) des signaux extraits, considérés comme les plus significatifs, sont parfois faibles (<0,5) et il serait nécessaire de compléter ces analyses en explorant les signaux les plus différenciellement accumulés même s'ils sont moins significatifs. La comparaison de l'effet des classes de QTLs dans les différentes conditions d'induction (constitutif, induit par ASM, induit par infection) sur l'accumulation des métabolites montre que l'effet des QTLs sur le métabolome étudié est supérieur après une infection, donc il est possible que l'infection soit nécessaire à l'expression des QTLs.

Pour explorer les signaux induits par la combinaison du traitement ASM et de l'infection, nous avons comparé l'intensité des métabolites dans les échantillons traités à l'ASM après l'infection (ASM+I) par rapport aux échantillons dans la condition témoin avant infection (Eau+NI). Pour mettre en évidence les signaux spécifiques à la combinaison ASM + infection, une analyse de corrélation a été menée entre les contrastes d'intensité des métabolites de la combinaison (ASM+I/Eau+NI) et les contrastes liés à l'infection (Eau+I/Eau+NI) (**Figure 46**). Les signaux fortement corrélés sont les signaux qui sont induits par l'infection et les signaux faiblement corrélés sont considérés comme induits par l'ASM ou la combinaison ASM + infection. Les corrélations entre les contrastes d'intensité des métabolites dans la combinaison et ceux liés au traitement ont également été analysées (données non présentées). Les graphiques de corrélation entre l'effet combiné ASM + Infection (ASM+I/Eau+NI) et l'effet de l'infection seule (Eau+I/Eau + NI) montrent une très forte relation

de linéarité quelle que soit la classe de QTLs avec des coefficients de corrélation de Pearson qui s'élève à $cor=0,85$ pour la classe sansQTL, $cor=0,87$ pour la classe F11F17, $cor=0,93$ pour la classe T1 et $cor=0,89$ pour la classe T1F11F17. Globalement, l'effet de la combinaison 'ASM+infection' sur le métabolome étudié n'est dû majoritairement qu'à l'infection. L'ASM ne semble pas avoir d'effet potentialisateur, car son application n'exacerbe pas significativement les défenses mises en place après une infection, ni d'effet modulateur important à l'échelle du métabolome étudié ici. Certains signaux s'écartent cependant fortement de la diagonale en particulier pour les classes sansQTL, F11F17 et T1F11F17. Ceux-ci mériteraient d'être analysés de plus près mais non pas pu l'être durant cette thèse faute de temps.

4- Discussion chapitre V

L'objectif de ce chapitre a été d'explorer les défenses constitutives et induites pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances génétiques et/ ou induites par les SDP. Les résultats montrent que les défenses constitutives étudiées ne semblent généralement pas être significativement impliquées dans la résistance à la tavelure et au feu bactérien. Les défenses induites sont modulées par les QTLs après infection mais globalement peu par l'ASM. Ces résultats sont discutés en détails dans les trois paragraphes suivants.

a- Le paradoxe des défenses constitutives dans la résistance à *Vi* et *Ea*

Dans certaines conditions, les défenses constitutives peuvent être significativement corrélées aux niveaux de résistances partielles après une infection. Ces résultats ont été démontrés notamment sur le riz pour la résistance contre *Magnaporthe oryzae* (Vergne et al., 2010). Nous avons donc cherché à identifier les défenses constitutives et induites du pommier qui expliquent le mieux les résistances quantitatives observées après une infection par *Vi* ou *Ea*. Le niveau de résistance quantitative d'un génotype peut être schématisé comme la somme du niveau des défenses constitutives et du niveau d'induction des défenses par l'infection. La **Figure 47** représente 4 hypothèses simplifiées de combinaisons entre les défenses constitutives et induites qui pourraient traduire la variation du niveau de résistance quantitative dans les génotypes. Soit le niveau des défenses constitutives ne varie pas en fonction des génotypes donc la variation des résistances quantitatives est liée à la seule variabilité du niveau des défenses induites. Soit les défenses constitutives varient en fonction des génotypes, et la variation du niveau de résistance quantitative est liée à la variation du niveau des défenses constitutives seules (si l'amplitude d'induction est constante) ou bien au cumul des variations des niveaux de défenses constitutives et induites. Dans la **Figure 47**, l'hypothèse selon laquelle les résistances constitutives et induites sont variables est simplifiée au seul cas d'une proportionnalité entre les niveaux de résistance mais il existe évidemment d'autres situations comme l'indépendance entre les résistances notamment.

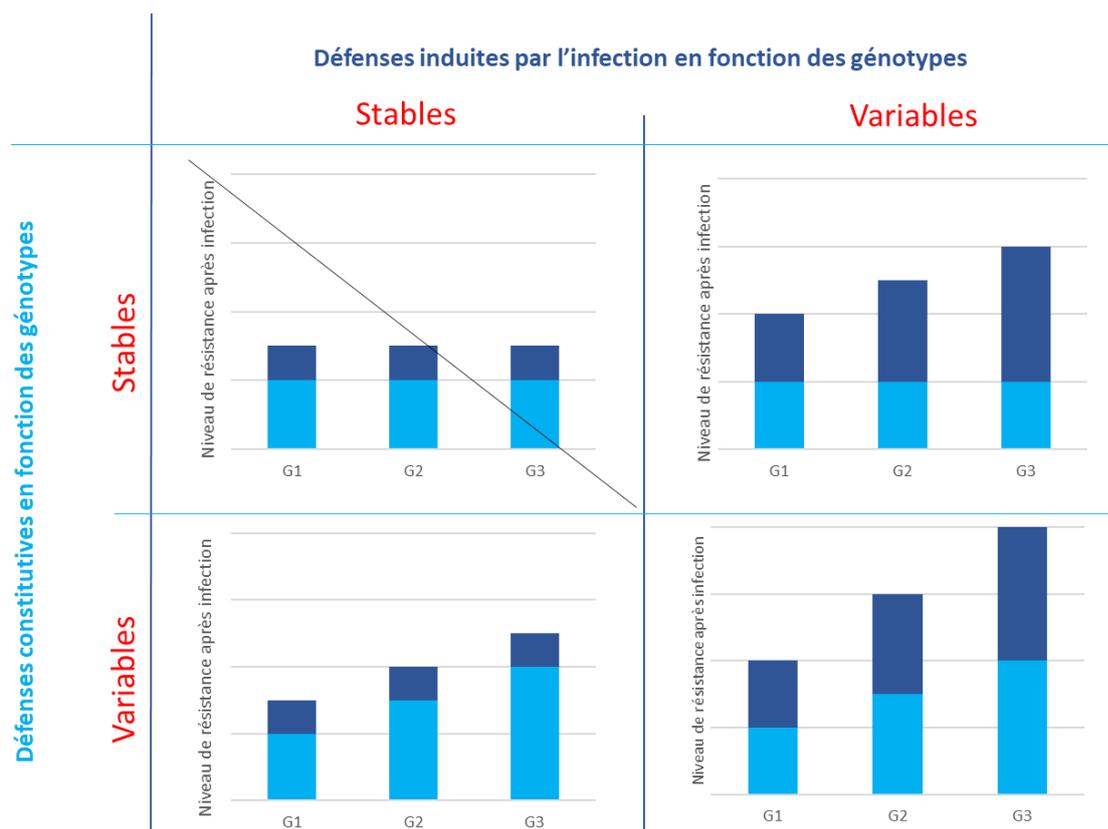


Figure 47 : Hypothèses sur le lien entre les résistances quantitatives et la variabilité des défenses constitutives et induites par l'infection. Le niveau de résistance apporté par les défenses constitutives est représenté en bleu clair et les résistances induites par l'infection sont représentées en bleu foncé dans les génotypes G1, G2 et G3.

Sur l'ensemble des gènes et des métabolites identifiés à l'état constitutif, aucun ne semble expliquer la variabilité des résistances observées. L'étude de l'expression constitutive des gènes de défense a plutôt révélé une répression des gènes *Extensin* et *Agg* corrélée à la résistance quantitative à la tavelure (sous-chapitre 2.c.) et l'accumulation différentielle des métabolites étudiés à l'état constitutif semble être principalement en faveur de la classe sansQTL par rapport aux autres classes avec QTLs (sous-chapitre 2.b.). Le gène *Agg* a été décrit comme impliqué dans la résistance au feu bactérien donc la corrélation de l'expression de ce gène à la sensibilité à la tavelure et l'absence de corrélation avec la résistance au feu bactérien sont des résultats surprenants. Cependant dans l'étude de Warneys et al., (2018), les gènes *Agg* sont induits après un traitement à l'ASM. Les extensines ont été décrites chez *Arabidopsis* comme des glycoprotéines riches en hydroxyproline de la paroi cellulaire (Yoshida, 2001), qui contribuent à la rigidification des parois les rendants plus résistantes lors de stress biotiques

(Lamport et al., 2011). Il est donc inattendu que l'expression des extensines soit corrélée à la sensibilité à la tavelure et contradictoire avec de précédents résultats observés chez *Arabidopsis* (Wei and Shirsat, 2006). Cependant une des hypothèses serait qu'une concentration très élevée en protéines produites par la surexpression constitutive du gène extensine dans certains génotypes pourrait être défavorable à la résistance contre la tavelure, mais aucune évidence dans la littérature ne conforte cette hypothèse.

Même si les études réalisées ne peuvent pas prétendre à être exhaustives, ces résultats suggèrent que les défenses constitutives du pommier ne sont vraisemblablement pas fortement impliquées dans les résistances à *Vi* et *Ea*. Les niveaux de résistances observés seraient alors liés majoritairement à l'induction de défenses au moment de l'infection.

Pourtant nous avons observé des contrastes importants dans l'expression constitutive de certains gènes de défense dépendant des génotypes étudiés. De plus, la variation de l'expression constitutive de ces gènes semble sous le contrôle de régulateurs cis et/ou trans. Des SNPs associés à la variation de l'expression de ces gènes ont été identifiés à proximité des séquences promotrices ou dans des gènes régulateurs de transcription. En effet, la localisation des SNP indique que les deux principaux eQTLs pour Agg et PR10 sont localisés à proximité de la séquence des gènes. Des SNPs situés dans le promoteur de la séquence ou dans le corps du gène, affectant notamment les marques épigénétiques, peuvent moduler la transcription de ces gènes (=régulation en cis) (Shrestha et al., 2018). Les SNPs que nous avons identifiés seraient donc en déséquilibre de liaison fort avec ces SNPs causaux des variations d'expression observées. Les régulations dites en trans au contraire sont des régulations qui interviennent non plus par des variations dans la séquence du gène ou de son promoteur mais par d'autres facteurs contrôlant son expression. Un des eQTLs de PPO co-localise avec un facteur de transcription MYB qui pourrait induire l'expression de ce gène (Dubos et al., 2010). Le SNP identifié dans le contrôle de l'expression du gène Agg sur le chromosome 15 est localisé au niveau du gène ABA Overly-sensitive 5. Ce gène, identifié chez *Arabidopsis*, code une protéine qui est impliquée dans la réponse à l'acide abscissique et notamment la régulation de gènes impliqués dans les stress (Liu et al., 2010). Une étude a montré que l'acide abscissique régule en particulier l'accumulation de lectines chez le blé (Raikhel et al., 1986). Les agglutines sont décrites comme des lectines donc ce gène pourrait également contrôler l'expression du gène Agg dans cette collection et à l'état constitutif (Warneys et al., 2018).

Cette variabilité génétique du niveau de défense basale sans lien avec les résistances à *Vi* et *Ea* pose la question de l'avantage évolutif du maintien de la régulation de ces gènes à l'état constitutif. Si la régulation de ces gènes n'apporte pas d'avantage direct pour la résistance à *Vi* et *Ea*, il est possible que les niveaux de défense constitutifs soient plus efficaces donc associés à la résistance à d'autres maladies même si le niveau de résistance basale n'est pas spécifique d'un bioagresseur. Il serait intéressant de comparer le groupe de variétés qui expriment fortement ces gènes de défense à l'état constitutif au groupe qui n'active pas ou que faiblement ces gènes pour leurs sensibilités à d'autres agents pathogènes. Cette démarche permettrait d'explorer une des hypothèses qui expliqueraient le maintien de la variabilité du niveau d'expression constitutive de gène de défense même si d'autres hypothèses pourraient être formulées.

Ensuite, les corrélations entre les défenses constitutives contrôlées par les gènes étudiés et la résistance à la tavelure et au feu bactérien ont été calculées à partir des données issues d'une core collection de 347 variétés. Pour la tavelure, les déterminants génétiques de la résistance observée au sein de cette collection sont très certainement à la fois des gènes majeurs et/ou des QTLs du fait de la fréquence des relations gène-pour-gène observée chez ce pathosystème (Gessler et al., 2006; Bus et al., 2011). Il est fort possible que cette diversité masque une éventuelle corrélation sous-jacente qui serait alors difficile à révéler. En effet les génotypes porteurs de gènes majeurs possèdent certainement des mécanismes de résistances très différents des génotypes porteurs de QTLs. Il faudrait alors étudier cette relation uniquement avec des génotypes pour lesquels les résistances ne seraient associées qu'à des QTLs. C'est ce qui a été fait au sein de la descendance TxF en étudiant le niveau de défense constitutive en fonction des seules classes de QTLs. Mais la diversité explorée était alors, par définition, très limitée et il est possible que d'autres QTLs dans d'autres génotypes expliquent mieux la variation observée dans les défenses constitutives.

b- L'induction faible des défenses par l'ASM ne reflète pas son efficacité de protection

Dans le chapitre III, nous avons mis en évidence un effet de protection de l'ASM qui varie de 24% à 100% en fonction de l'agent pathogène et des résistances génétiques. Nous avons donc comparé l'expression de gènes de défense et le métabolome deux jours après traitement par rapport à la condition témoin pour identifier les mécanismes induits par l'ASM.

Sur les 13 gènes étudiés en expression, nous n'avons mis en évidence que trois gènes faiblement induits ou réprimés par le traitement (CAD, HMGR et PR10). L'approche métabolomique ne nous a permis de détecter qu'un nombre relativement limité de signaux métaboliques différenciellement accumulés en présence d'ASM par rapport au témoin (Eau). Les différentes analyses ne nous ont donc pas permis d'isoler un effet important et clair de l'ASM mais seulement des modulations localisées à l'échelle de voies de défense (flavonoïdes, les acides gras, les acides galliques et les chlorines). De plus cet effet d'induction n'est pas amplifié après l'infection donc l'ASM, dans les conditions de cette étude, ne semble pas non plus avoir d'effet potentialisateur. Globalement les défenses induites par l'ASM sont communes entre les classes QTLs mais les intensités d'induction sont variables. Les contrastes d'expression et d'accumulation de métabolites entre le traitement à l'ASM et la condition témoin sont plus importants dans la classe T1F11F17.

Ces résultats sont surprenants puisque le traitement ASM montre un effet majeur pour la protection contre *Vi* et *Ea*. De plus, l'article de Warneys et al., (2018) présente l'effet de l'ASM trois jours après application sur la modulation des défenses dans les feuilles de jeunes semis de Golden Delicious par une approche microarray. Par cette approche, 4 327 gènes ont été identifiés comme différenciellement exprimés après traitement ASM par rapport à la condition témoin.

Notre étude porte sur 13 gènes et une gamme de métabolites parmi l'ensemble des défenses possibles, donc une première hypothèse serait que les défenses étudiées ne soient pas celles modulées par l'ASM. Parmi les 4327 gènes identifiés par Warneys et al., (2018) comme induits par l'ASM, le gène PR-4 est commun à la liste de gènes étudiés dans ce chapitre et de même pour les gènes CSL, HMGR, WRKY qui ont été identifiés comme induits par l'ASM dans les articles de Dugé de Bernonville et al., (2014) ou Marolleau et al., (2017). Les différences entre

ces trois articles et notre étude peuvent provenir du type de matériel végétal utilisé (semis ou greffe) et/ou de la diversité génétique du matériel étudié. Pour comprendre l'influence du matériel végétal, nous avons récemment analysé l'expression des gènes PR4 et CSL sur des échantillons de feuilles issues de greffes de la variété Golden Delicious. Les résultats (non détaillés ici) montrent une surexpression attendue de ces deux gènes après un traitement à l'ASM. Cependant, les différentiels d'expression sont beaucoup moins importants que sur semis de Golden Delicious (d'après les résultats publiés dans Dugé de Bernonville et al., 2014). Des répétitions sont nécessaires pour confirmer ces observations, mais ces résultats préliminaires suggèrent que le type de matériel végétal (greffes *versus* semis) puisse expliquer en partie la diminution apparente de l'effet de l'ASM sur la variation des défenses telle qu'observée dans notre étude. La physiologie des plants greffés serait potentiellement plus complexe que celle des semis, donc des interactions entre voies métaboliques pourraient masquer les différences liées au traitement entre les échantillons au niveau moléculaire.

c- Des voies hormonales, des flavonoïdes et des acides gras impliqués dans la résistance à *Vi*

L'infection présente un effet d'induction important, qui dépend des classes de QTLs. La plupart des gènes étudiés (8/13) sont significativement induits ou réprimés après l'infection. Si on considère que l'effet des QTLs est révélé après une infection (et non pas à l'état constitutif), il apparaît évident que l'induction des défenses par l'infection dépend des classes de QTLs. Dans les classes partageant qT1, les gènes impliqués dans la voie de régulation SA sont activés et ceux de la voie JA réprimés. Dans les classes sansQTL et F11F17, cette co-régulation n'est pas observée. Donc le QTL qT1, décrit comme récepteur potentiel impliqué dans la reconnaissance du champignon, pourrait activer une cascade de signaux qui déclenche la signalisation SA et ainsi une co-régulation de la voie JA. D'autres voies sont induites par l'infection comme la voie des flavonoïdes, des chlorines, des acides gras, des composés phénoliques et des terpénoïdes. Plusieurs voies induites par l'infection sont communes aux différentes classes de QTLs mais de façon identique au contraste du traitement, le contraste de l'infection est exacerbé dans la classe T1F11F17.

L'effet de la combinaison ASM+infection sur les défenses ne semble dépendre que de l'infection. Presque aucune interaction n'est observée en comparant le métabolome induit par la combinaison des résistances ou le métabolome induit par l'infection seulement. Ce résultat est surprenant puisque l'efficacité de protection de l'ASM après une infection varie significativement en fonction des résistances génétiques.

Une partie importante des métabolites identifiés est associée aux voies des flavonoïdes et des acides gras. Ces métabolites ont été identifiés dans les contrastes des classes de QTLs à l'état constitutif comme dans les contrastes ASM/Eau et Infecté/non infecté.

Les flavonoïdes sont décrits dans la review de Biharee et al., (2020) comme une vaste famille de métabolites secondaires divisés en sous-familles comprenant les flavonols, les flavanols, les flavanones, les anthocyanidines, les chalcones et les dihydrochalcones et impliqués dans un grand nombre de fonctions dont la réponse aux stress biotiques. Les flavonoïdes peuvent être accumulés constitutivement ou après infection pour constituer des barrières chimiques limitant le développement des agents pathogènes. La diversité de la nature des molécules de cette famille implique un grand nombre d'activités moléculaires. De plus, des études ont également confirmé le lien potentiel entre les flavonoïdes chez le pommier, spécifiquement et la résistance à *Vi* : L'accumulation de phloridzine et de phlorétine est associée à la résistance quantitative à *Vi*, en créant potentiellement un environnement nocif pour son développement (Leser and Treutter, 2005; Petkovšek et al., 2009; Sarkate et al., 2018; Mansoor et al., 2020). Gaucher et al., (2013) ont également montré que les dihydrochalcones s'accumulent principalement dans les couches supérieures des feuilles de pommier ainsi que dans les cellules parenchymateuses présentes au niveau des faisceaux vasculaires, suggérant que les dihydrochalcones pourraient constituer une barrière physico-chimique contre les agents pathogènes colonisant les couches supérieures des feuilles, tel que *Vi*. Cette description concorde avec les résultats obtenus dans ce chapitre, à savoir un rôle potentiel des flavonoïdes dans les défenses constitutives et induites dans le cadre de la résistance à *Vi*. Cependant il serait nécessaire d'affiner les déterminations pour préciser les mécanismes moléculaires (quels composés dans la famille des flavonoïdes ?) spécifiques et communs à l'ASM et à l'infection dans les différentes classes de QTLs.

La famille des lipides est également composée d'une grande diversité de molécules associées à des fonctions variées dépendant des propriétés physico-chimiques de ces molécules (Shah

and Chaturvedi, 2009). Les lipides sont impliqués dans les barrières physiques, dans la communication hôte-pathogène, dans la signalisation et la stimulation des défenses des plantes et comme molécules de défense (Shah and Chaturvedi, 2009). Un grand nombre d'études ont révélé le rôle des lipides et des métabolites lipidiques lors des interactions entre les plantes et les agents pathogènes : (i) par la voie de la lipoxygénase avec la production d'oxylipines et par exemple d'acide jasmonique (JA), qui sont des molécules de signalisation importantes pour la régulation des défenses (Feussner and Wasternack, 2002) (ii) par la voie des acides gras insaturés par le remodelage de la composition des lipides membranaires (défenses constitutives) et la signalisation de défense (défenses induites), (Upchurch, 2008) et enfin (iii) par la voie des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) (Raffaele et al., 2009).

La régulation de la composition en acides gras associée à la résistance aux agents pathogènes a été confirmée chez le pommier (Zhang et al., 2019) mais le rôle des acides gras dans les résistances génétiques et induites par une infection ou l'ASM sera exploré en précisant la détermination des métabolites identifiés.

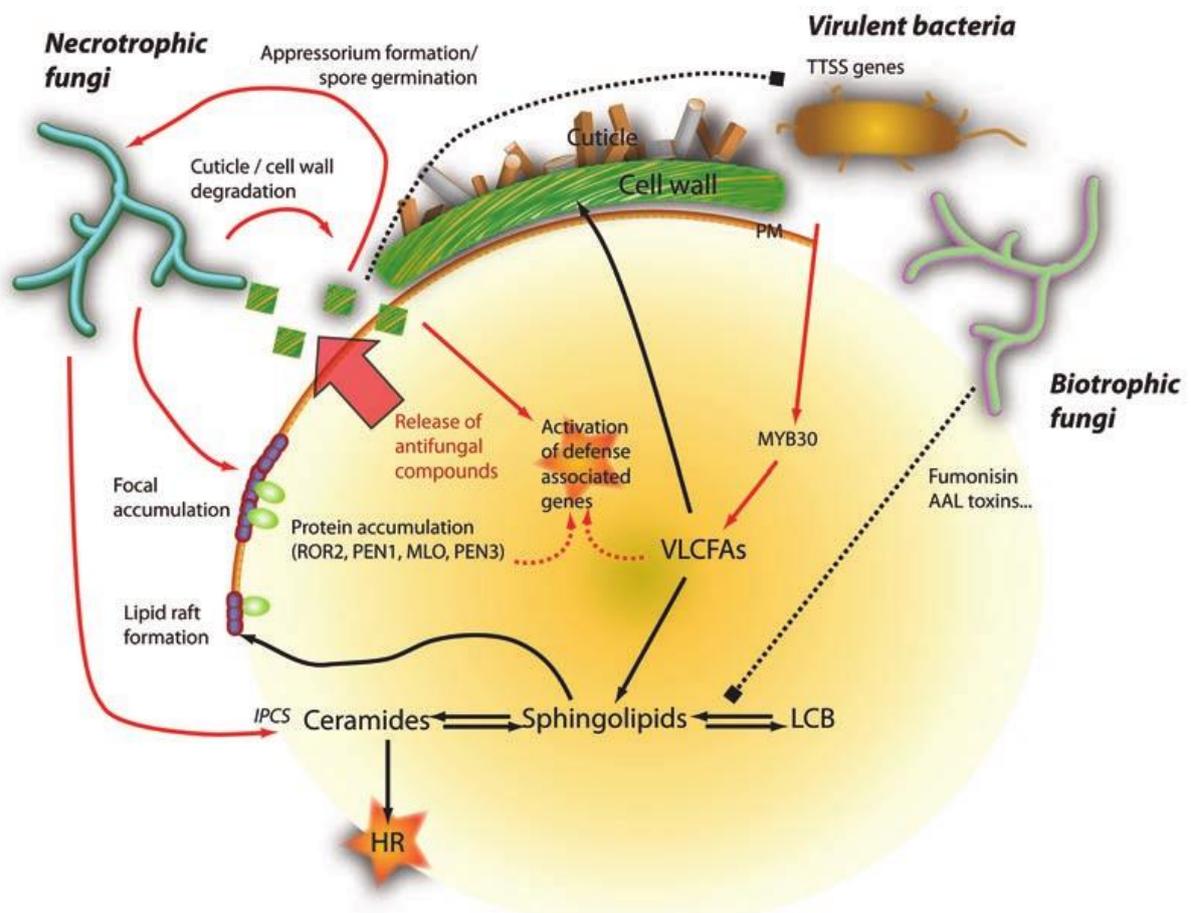


Figure 48 : Schéma résumant la contribution des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) et des molécules dérivées d'AGTLC dans le dialogue moléculaire qui se produit lors des interactions plantes-pathogènes. Les échanges entre la plante et les différents agents pathogènes impliquent (i) les AGTLC et la synthèse des sphingolipides, (ii) les composés cuticulaires et (iii) l'organisation des microdomaines des particules. En conséquence, la croissance des pathogènes est affectée de manière différenciée par l'apparition des réponses hypersensible (HR), en fonction de leur stratégie d'invasion (par exemple, positivement pour les champignons nécrotrophes, négativement pour les champignons biotrophes). Les flèches rouges simples indiquent un effet positif ; les lignes pointillées noires, un effet négatif, les flèches rouges pointillées indiquent un effet positif supposé. PM, membrane plasmique ; TTSS, système de sécrétion de type trois ; LCB, base à longue chaîne ; HR, réponse hypersensible (Raffaele et al., 2009).

Le rôle des flavonoïdes et des acides gras dans la résistance (constitutive ou induite) à *Vi* doit être confirmé avec les résultats des dosages métaboliques en cours (échantillons 2020) et précisé. La détermination des métabolites peut être affinée par une nouvelle analyse des formules brutes des signaux ou par une approche de détermination en réseau. Le logiciel MetGem (Olivon et al., 2018) a été développé pour visualiser les données de spectrométrie de masse. L'intérêt de ce logiciel est d'associer des signaux indéterminés à des voies métaboliques par la proximité de leurs valeurs MS2 par rapport à d'autres signaux déterminés. Cette approche a pour avantage de mettre en évidence un plus grand nombre de métabolites, alors qu'ils sont pour le moment très limités. Une approche intégrative en réseau combinant les données de dosages métaboliques et d'expression de gènes (en entreprenant des analyses transcriptomiques) permettrait de reconstruire la complexité des défenses dans les résistances génétiques et induites ainsi que leurs interactivités. Cette approche intégrative a permis de déterminer les fonctions clés de la résistance quantitative aux maladies chez *Arabidopsis* à partir de données transcriptionnelles et protéomiques (Delplace et al., 2020).

Chapitre VI :

Discussion générale et perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'explorer pour la première fois les facteurs de l'interaction potentielle entre les QTLs de résistance et les SDP. Les résultats acquis ont apporté des éléments de réponse sur les déterminismes et les mécanismes qui interviennent lors de la combinaison de ces deux types de résistance dans le cadre de la tavelure et du feu bactérien du pommier. Cependant, il reste encore beaucoup de questions sur la nature des interactions et les mécanismes. Ce dernier chapitre présente une analyse sur les choix expérimentaux, sur l'impact des principaux résultats et sur les perspectives de cette étude.

1- Analyse critique des choix méthodologiques et stratégiques

La synthèse des résultats de trois années d'étude a permis de mettre en évidence les limites des expérimentations qui ont été menées. Ce paragraphe propose une discussion critique sur certains choix méthodologiques et stratégiques qui ont été faits en amont et pendant la thèse. Des améliorations sont proposées pour les prochaines expérimentations.

a- Contrôler les biais pour améliorer la précision des données

L'analyse des données phénotypiques et moléculaires a nécessité des corrections statistiques pour s'affranchir de multiples biais techniques. Ces corrections, généralement réalisées après analyse de variance, permettent d'extraire l'effet de facteurs particuliers, s'il est possible de les détecter, mais restent imparfaites. Contrôler ces biais permettrait d'augmenter la précision des données.

La précision des données phénotypiques repose essentiellement sur deux facteurs : la qualité du matériel végétal et la notation des symptômes. Le développement de *Vi* et *Ea* est conditionné par la bonne croissance des plantes inoculées, donc contrôler la physiologie des plantes est essentiel. Avant chaque test, des greffes ont été jugées inadéquates et écartées sur des critères de taille, de croissance ou d'état sanitaire. Pour limiter ces pertes de matériel végétal et les corrections liées aux biais environnementaux, il faudrait contrôler plus strictement les conditions environnementales en serre en réalisant la culture et les tests dans des chambres de culture par exemple. Des essais préliminaires ont été réalisés en chambre de culture mais se sont révélés non concluants, probablement à cause de l'éclairage par LED non maîtrisé à ce moment-là. D'autres tests réalisés dans l'unité dans des chambres de culture éclairées par des lampes à sodium ont abouti à un développement optimal des plants et de la tavelure. La limite principale des chambres de culture reste la faible surface disponible qui limite l'effectif de plants par test.

Les notations de la tavelure et du feu bactérien sont basées sur les appréciations de notateurs ce qui entraîne un biais de subjectivité (variable selon les notateurs) qui peut entraîner une baisse de l'héritabilité et expliquer les faibles corrélations observées (augmentation de la variabilité intra-génotype) entre certains tests, même si les différences de conditions

environnementales y contribuent nécessairement aussi. Développer des outils de quantification de maladie plus objectifs, permettrait de s'affranchir de ce biais. La quantification directe des agents pathogènes est une alternative potentielle mais cette méthodologie est difficilement applicable sur les effectifs de cette étude et l'évaluation des symptômes par des technologies d'imagerie est en cours de développement mais pour le moment n'est pas suffisamment efficace pour remplacer l'œil humain (Douarre et al., 2019).

Enfin disposer de davantage de copies (répétitions biologiques) par génotype et par condition explorée reste toujours le meilleur moyen d'améliorer l'estimation des effets moyens. Mais le nombre de génotypes et de combinaisons de facteurs étudiés durant cette thèse étaient déjà très importants, ce qui a bien souvent imposé de limiter le nombre de répétitions biologiques pour des raisons de place, de coûts et de temps de préparation du matériel et de notation.

La précision des données moléculaires repose sur la qualité de l'échantillonnage et des échantillons, de la feuille à l'ADNc/métabolite et sur les choix méthodologiques. Nous avons choisi pour cette étude de suivre une quinzaine de gènes en RT-qPCR sur plus de 1500 échantillons au total. Cet effectif nous a imposé une gestion et une traçabilité optimale des échantillons, malgré tout certaines informations n'ont pas été retrouvées. De plus, nous avons constaté que la validation d'amorces fonctionnelles était une étape très limitante pour le choix des gènes. La stratégie et la méthodologie de suivi de l'expression des gènes de défense mises en œuvre dans le cadre de notre étude ne sont peut-être pas les plus adaptées.

L'objectif est de mettre en évidence des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre les résistances génétiques et l'ASM. En remplacement ou complément de ce que nous avons mis en place dans cette étude, nous pourrions imaginer une analyse sans a priori des gènes différentiellement exprimés (par puce d'expression AryANE_v2 nouvelle génération, ou mieux par RNA-seq) dans des groupes de génotypes contrastés pour leur interactivité avec l'ASM. La notion d'interactivité est complexe car elle n'est mesurable qu'à l'échelle d'une population et non d'un génotype isolé et nous souhaitons comparer la contribution des génotypes entre eux pour identifier les mécanismes influençant cette interaction. Dans un premier cas, nous pourrions comparer quelques génotypes qui ont le même niveau de sensibilité dans la condition témoin et des niveaux de sensibilité nettement différents après traitement à l'ASM. Les différences phénotypiques mesurées devraient représenter une interactivité avec l'ASM très significative ('robuste'), en reposant sur des évaluations basées

sur un grand nombre de répétitions biologiques. Dans un second cas, nous pourrions traduire l'interactivité par un terme d'efficacité (**Figure 49**) : nous pourrions comparer trois groupes de génotypes, de niveau de sensibilité intermédiaire, pour lesquels l'efficacité de l'ASM est faible, intermédiaire ou forte. Cette première étape sans a priori permettrait de limiter les biais liés aux manipulations d'échantillons, de s'affranchir de la limite du dessin d'amorce qui contraint fortement la sélection des gènes et de l'hétérogénéité des populations en se focalisant sur la variable d'efficacité de l'ASM.

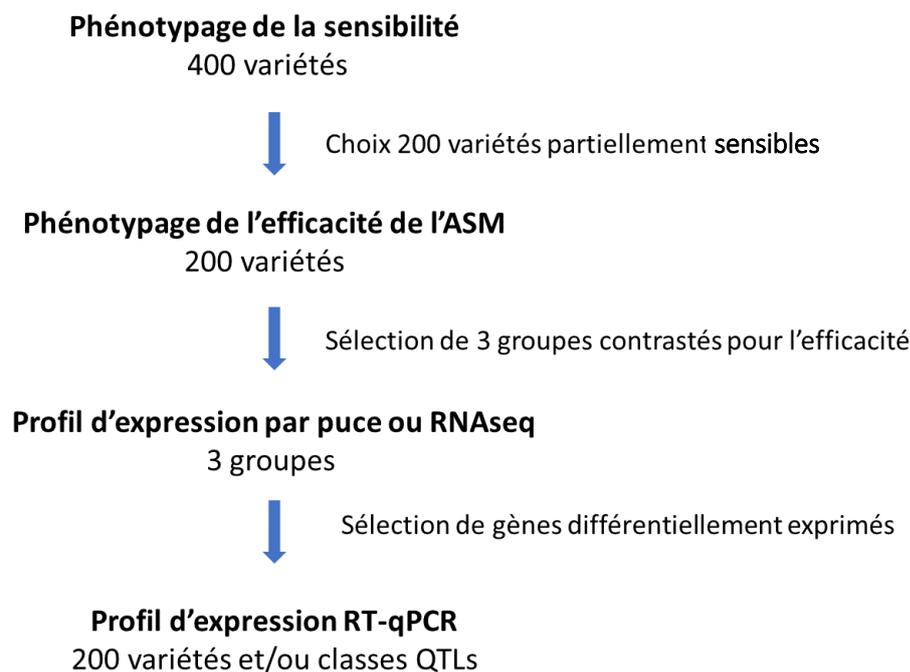


Figure 49 : Etapes d'une des stratégies alternatives proposée pour explorer les gènes impliqués dans la variabilité de l'efficacité de l'ASM.

b- Optimiser les méthodologies et les stratégies expérimentales

Les plans expérimentaux, établis en amont de l'acquisition des données, conditionnent les résultats. En effet, chaque étude répond à un modèle qui est défini par des paramètres qui ont été choisis. Il est donc important de contrôler chaque paramètre pour cibler la question de recherche. Les expérimentations menées au cours de cette thèse ont été réfléchies sur la base de protocoles établis. Certains facteurs déterminants ont été optimisés lors de tests préliminaires comme le choix de la souche de *Vi*, la concentration en inoculum, la

concentration et le nombre d'application de SDP pour les tests de sensibilité. Cependant d'autres facteurs, qui n'ont pas pu être testés, pourraient se révéler déterminants.

Concernant les tests de sensibilité et d'efficacité de l'ASM, nous pouvons questionner le choix du délai entre application de l'ASM et inoculation du pathogène. La plupart des études mettent en évidence l'efficacité de protection de l'ASM lorsque le traitement est appliqué 2 à 3 jours avant l'infection ou en cascade entre 10 et 2 jours avant l'infection (Bengtsson et al., 2009; Marolleau et al., 2017; Warneys et al., 2018). Si l'interaction entre les résistances génétiques et l'ASM intervient à un moment précis de la mise en place des défenses, il faut s'assurer de suivre les défenses dans cet intervalle de temps. La principale question concerne la chronologie d'action des résistances génétiques et induites par l'ASM. Puisque l'ASM est appliquée avant l'infection on peut se demander si l'effet de l'ASM dépend du fond génétique ou bien si c'est plutôt l'effet des QTLs qui est modulé par l'ASM. Comment l'effet de l'ASM peut-il dépendre du fond génétique, si les voies métaboliques modulées par les résistances génétiques sont encore inactives lors de l'application du traitement ? Inversement, si certains QTLs de résistance contrôlent un niveau variable de défenses constitutives, alors l'effet de l'ASM serait postérieur à ces défenses constitutives et serait alors dépendant du fond génétique.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que le traitement à l'ASM appliqué après la mise en oeuvre des résistances génétiques induites (c'est-à-dire après l'infection) puisse entraîner davantage d'interaction avec ces résistances, par exemple en augmentant ou diminuant l'efficacité de certaines d'entre elles plus fortement que pour une application d'ASM avant infection. Il est généralement admis que les SDP agissent plutôt en préventif mais dans l'hypothèse proposée, ils pourraient plutôt agir en curatif en « aidant » les mécanismes sous-jacents aux QTLs après infection (suractivation des mêmes voies ou voies complémentaires) de manière synchrone. Il serait donc intéressant de tester différentes combinaisons de temps d'application de l'ASM en conditions contrôlées pour suivre plus exhaustivement l'évolution des défenses sous contrôle génétique et/ou induites par l'ASM et pour mieux décortiquer leurs interactions et les mécanismes mis en jeu.

Concernant les analyses moléculaires, nous pourrions aussi chercher à évaluer l'influence de la taille des populations étudiées et le nombre de répétitions ou la méthode d'extraction pour le dosage des métabolites. En ce qui concerne la méthode d'extraction à l'eau et au méthanol

pratiquée pour notre étude – méthode standard -, celle-ci permet d'extraire une gamme de métabolites de taille intermédiaire (Villas-Bôas et al., 2005) et solubles dans ces solvants mais ne permet pas d'extraire la totalité des métabolites. Pour ce faire, il faudrait diversifier le type de solvants, en jouant en particulier sur leur polarité. L'analyse effectuée au cours de ce travail de thèse n'est donc que partielle, et pourrait être complétée.

c- Choix du matériel végétal

Nous avons choisi d'étudier les interactions entre les résistances génétiques et les SDP sur deux populations différentes : une descendance F1 où ségrègent des QTLs de résistances à la tavelure et au feu bactérien, et une core collection de 408 variétés dans laquelle se trouve une large diversité de résistances génétiques. Ces deux populations sont complémentaires et semblent adaptées à l'étude mais elles n'ont pas permis de révéler des interactions fortes entre les résistances génétiques et induites (testées sur la descendance et uniquement un sous-ensemble restreint de la collection de ressources génétiques, la CCE_32). Ces résultats peuvent s'expliquer par deux hypothèses :

1- La descendance est composée de QTLs dont certains sont à fort effet et pourraient masquer d'éventuelles interactions ASM-QTLs. En effet, le QTL qT1 seul confère plus de 70% de protection par rapport à la souche EU-B04. Les détections de la plupart des QTLs ont été réalisées sur la demi-population des génotypes porteurs de l'allèle défavorable au niveau de qT1. Les interactions ASM-QTLs ont donc été recherchées sur la moitié de la descendance, ce qui affecte la puissance de détection. Nous pourrions envisager de répéter cette étude sur une descendance composée de QTLs plus modérés pour augmenter les contrastes d'interaction avec l'ASM.

2- La core collection est composée de 408 variétés qui regroupent des résistances génétiques très diverses incluant vraisemblablement à la fois des gènes majeurs de résistance et des QTLs. Comme indiqué auparavant (V-4-a), l'hétérogénéité de cette collection peut expliquer l'absence de corrélation observée entre l'expression de gènes de défense et les résistances quantitatives. Cette hétérogénéité a déjà été incriminée lors d'analyses de GWAS tentées par l'équipe sur des données de résistance à la tavelure (différentes souches de *Vi* testées), car aucun SNP significatif n'avait été détecté pour plusieurs tests réalisés. Un nombre trop

important de gènes majeurs (impliqués dans des relations gène-pour-gène) présents à faible fréquence dans la core collection pourrait être la cause vraisemblable de ces résultats de GWAS très décevants. La présence de ces mêmes gènes majeurs pourrait rendre la recherche de corrélations entre l'expression de gènes de défense et le niveau de résistance quantitative quasi-impossible. Face à cette situation, il faudrait soit étudier les corrélations sur une collection plus homogène en terme de nature de résistance (cf discussion chap V) ou définir dans cette core collection des sous-groupes contrastés en termes d'expression des gènes de défense étudiés. Ainsi nous pourrions comparer le génome des génotypes pour lesquels les gènes de défenses sont soit sur-exprimés soit sous-exprimés et identifier les déterminants génétiques de cette variabilité et si c'est possible le lien avec les résistances.

2- Les mécanismes moléculaires impliqués dans les résistances du pommier

Dans ce manuscrit, nous avons montré que les résistances quantitatives sont très vraisemblablement liées à l'expression de défenses induites plutôt que constitutives. Par une approche de cartographie, nous avons précisé les intervalles de confiance de QTLs importants pour la résistance à la tavelure et au feu bactérien et mis en évidence le fait que les voies de défense impliquées dans ces QTLs ne semblent que faiblement en interaction avec les voies de défense de l'ASM. Aucun QTL de réactivité spécifique à l'ASM n'a pu être identifié. L'effet de l'ASM semble s'ajuster aux flux de défenses initié/modulé par les QTLs présents dans chaque génotype. Ces résultats ne donnent pas lieu à des applications directes en termes de combinaisons particulières de QTLs avec l'ASM pour le moment, mais ouvrent des perspectives pour de nouveaux travaux de recherche.

a- Rôle des défenses constitutives dans la résistance du pommier

Treize gènes ont été étudiés sur un effectif de génotypes restreint et trois gènes sur la totalité de la core collection pour explorer la corrélation entre les défenses constitutives et les résistances quantitatives. Nous n'avons pas identifié de corrélation stable entre l'expression des défenses constitutives et les résistances à la tavelure et au feu bactérien (dans la limite des données de résistances disponibles), malgré la variabilité génétique de l'expression des

gènes étudiés. Dans le but d'approfondir le rôle des défenses constitutives chez le pommier, il serait intéressant de compléter ces résultats par deux approches :

Explorer d'autres gènes de défense pour la tavelure et le feu bactérien : Nous avons exploré un nombre très limité de gènes de défense. Il serait intéressant d'explorer la variabilité et la corrélation de l'expression constitutive d'un plus grand nombre de gènes de défense par rapport à la résistance la tavelure et au feu bactérien en réalisant des analyses globales.

Explorer d'autres stress biotiques du pommier : Nous avons déjà discuté de l'impact de l'hétérogénéité de la core collection étudiée sur les résultats de corrélation. Cependant une autre hypothèse est que l'expression constitutive des gènes étudiés pourrait être corrélée à la résistance à d'autres bioagresseurs. Nous pourrions tester la corrélation entre l'expression constitutive des trois gènes de défense étudiés (Agg, PPO, PR-10) et la résistance à d'autres maladies ou ravageurs comme le puceron cendré, le carpocapse, le chancre à *Nectria* ou l'oïdium par exemple.

Dans les deux études, il reste à comprendre les liens entre les défenses constitutives et induites pour comprendre les facteurs qui déterminent la capacité d'induction des défenses en fonction des génotypes.

b- Vers la compréhension des mécanismes de résistance à la tavelure et au feu bactérien

Au cours de cette étude nous avons cherché à identifier les mécanismes impliqués dans les résistances génétiques et induites par l'ASM. Nous avons mis en évidence des listes de gènes ou signaux métaboliques candidats corrélés aux résistances mais sans preuve de leur implication dans les mécanismes. Identifier les mécanismes à l'origine des résistances génétiques et induites par l'ASM, individuellement, est essentielle pour comprendre ensuite les interactions entre ces résistances.

Identifier des gènes et métabolites candidats associés aux QTLs de résistance

L'étude de cartographie de QTL a permis de confirmer et réduire les intervalles de confiance de certains QTL importants vis-à-vis de la résistance à la tavelure et au feu bactérien (qT1, qF11, qF17 et qF7). Nous avons identifié quelques centaines de gènes candidats sous-jacents

à chacun de ces QTLs. Comparer l'expression de chacun de ces gènes dans des génotypes porteurs ou non de l'allèle de résistance au niveau du QTL pourrait permettre de réduire la liste des candidats, si la résistance apportée par chacun des QTLs ne provient pas d'une simple différence dans la structure protéique mais plutôt d'une différence du niveau d'expression du gène. Cependant cette approche supposerait le dessin et la validation d'un trop grand nombre de couples d'amorces, travail d'autant plus compliqué chez une espèce comme le pommier malgré la disponibilité de séquences génomiques de référence. Une démarche plus efficace serait alors d'utiliser l'approche RNAseq ou les puces d'expression. De plus, même si des corrélations entre la présence de l'allèle favorable des QTLs et la sur-expression de gènes étaient identifiées, in fine, seule la validation fonctionnelle apporterait une preuve formelle de l'identité du gène causal sous-jacent au QTL. Pour s'affranchir de la variation du génome, il faudrait utiliser des populations de lignées recombinantes (RIL) or chez le pommier les seuls « pseudo-RIL » dont nous disposons sont des lignées transgéniques comme celle issue du fond génétique de la variété Gala dans lequel le gène *Rvi6* a été introduit (Joshi et al., 2011). Sur cette lignée, comparativement à la variété Gala, des analyses transcriptomiques sur une cinétique après infection ont été réalisées dans le cadre du projet TIFON afin de décortiquer les voies de défenses associées au gène *Rvi6* (Perche pied et al., *in prep*).

Une autre approche a été imaginée pour identifier ou se rapprocher des mécanismes sous-jacents de ces QTLs sans passer par des études d'expression ou de validation fonctionnelle tant que la liste n'est pas réduite à quelques gènes. Une cartographie de QTLs de métabolites (mQTLs) sans a priori sur ces derniers sera réalisée sur l'ensemble des descendants de la descendance TxF (dans le cadre d'une prochaine thèse). L'approche que nous avons développée sur un nombre limité de descendants (représentants des classes QTLs) va donc être étendue à l'ensemble de la famille. L'objectif sera d'identifier les mQTL qui colocaliseraient avec les QTLs de résistance à la tavelure et au feu bactérien.

Poland et al., (2009) ont résumé les mécanismes potentiellement associés aux QTLs en 6 catégories. Les mécanismes sous-jacents aux QTLs peuvent être :

- Des gènes impliqués dans la régulation de la morphologie et du développement
- Des gènes impliqués dans les défenses constitutives
- Des gènes impliqués dans les barrières physiques et chimiques (défenses induites)
- Des gènes impliqués dans la signalisation

- Des gènes majeurs de résistance mutés ou récepteurs à effet partiel
- Des gènes de fonction inconnue

Dans la plupart de ces catégories, les différences entre les génotypes porteurs des allèles de résistance et de sensibilité sont liées à des modifications du métabolisme cellulaire.

Les QTLs modulent potentiellement plusieurs voies dont peut-être une seule est la cause réelle de la résistance observée. Donc en se focalisant sur les mQTLs qui colocalisent avec les QTLs de résistance nous pourrions :

- 1- Identifier des métabolites candidats, considérés comme plus proches du phénotype de résistance finale (par rapport à l'expression de gènes de défense ou des marqueurs génétiques).
- 2- Explorer si parmi les métabolites colocalisant avec les QTLs de résistances, certains sont connus pour leur implication dans des mécanismes de résistance chez d'autres pathosystèmes.
- 3- Comparer les métabolites identifiés à la liste de gènes dans l'intervalle de confiance des QTLs de résistance pour identifier les convergences entre gènes- et métabolites-candidats.
- 4- Tenter d'isoler les métabolites-candidats les plus prometteurs, faire synthétiser ces métabolites et engager ensuite des tests biologiques sur la croissance de *Vi* ou *Ea in vitro*.

Cette étude correspondra à une des parties du projet de thèse MetaNIRS soumis par l'équipe pour financement, et qui devrait débiter l'année prochaine en cas de succès.

La transformation génétique pour valider les gènes candidats des QTLs et comprendre le lien entre les résistances génétiques et l'efficacité de l'ASM

Une perspective à plus long terme serait de valider fonctionnellement les gènes candidats par une approche de transformation génétique. Les nouvelles technologies de mutagenèse CRISPR sont en cours de développement sur le pommier (Nishitani et al., 2016; Charrier et al., 2019; Pompili et al., 2020). Des premiers essais prometteurs sur pommier dans notre équipe

ont permis d'éditer le gène de phytoène désaturase (PDS) produisant un phénotype albinos, et le gène Terminal Flower 1 (TFL1.1) conduisant à une floraison précoce, ceci dans le cadre du projet ANR Genius (Charrier et al., 2019). Pour valider les candidats sous les QTLs, nous pourrions développer des lignées transgéniques KO pour ces gènes et vérifier l'obtention de phénotypes sensibles lors d'infections par la tavelure ou le feu bactérien. La mise au point de la transformation sur de nouveaux génotypes reste néanmoins un challenge. En cas d'échec, la surexpression des gènes candidats chez une variété transformable, telle que 'Gala', reste une option possible.

Le second intérêt d'une telle approche concerne l'étude des mécanismes impliqués dans l'efficacité de l'ASM. Ces mêmes lignées KO pour les gènes candidats aux QTLs pourraient ainsi également être testées par rapport à l'efficacité à l'ASM. Au-delà, nous pourrions envisager de produire quelques lignées transgéniques de 'Gala' affectées dans certaines voies de défense associées aux QTLs et de comparer l'efficacité de l'ASM sur ces lignées. En effet, il n'existe pas de collection de mutants chez le pommier, qui permettrait ce travail à plus large échelle. Outre étudier l'interaction ASM-QTL en s'affranchissant de la variabilité des fonds génétiques, nous pourrions avec cette approche mettre en évidence des voies qui affectent l'efficacité de l'ASM, ainsi que les éventuelles compensations de résistance par l'ASM. Une fois ces lignées créées, nous pourrions les utiliser pour cribler un grand nombre de SDP afin d'analyser les mécanismes d'interactions SDP-QTL plus largement.

3- Combinaison des QTLs et de l'ASM pour une lutte durable ?

Dans ce manuscrit nous avons mis en évidence que les résistances génétiques et induites par l'ASM et le PhP sont complémentaires. Ces résistances interviennent dans des voies de défense indépendantes ou interactives selon les résistances génétiques. Ces premiers résultats nécessitent d'être confirmés et approfondis et pourraient avoir par la suite des applications pratiques pour la lutte contre les bioagresseurs en verger.

a- La combinaison des résistances génétiques et induites par l'ASM dans un itinéraire technique allégé

Marolleau et al., (2017) ont étudié l'efficacité de protection vis-à-vis de la tavelure de l'ASM intégré dans un itinéraire technique en verger. Bien que significative et associée à une réduction notable de fongicides, cette efficacité reste cependant insuffisante dans un contexte de production. Les conditions influençant l'efficacité de l'ASM en vergers sont à explorer pour optimiser les traitements. Par exemple, si les caractéristiques pédoclimatiques dans les vergers influencent l'efficacité de l'ASM, des outils d'aide à la décision pourraient être développés pour optimiser les dates d'application et la fréquence de traitements en fonction de ces facteurs.

Les études en vergers, décrites dans Marolleau et al., (2017), ont été menées sur la variété sensible Golden Reinders. Or, nous avons montré dans les chapitres précédents que le traitement à l'ASM permet en conditions contrôlées de protéger quasi-totalement les génotypes porteurs de multi-résistances génétiques. En combinant les résistances génétiques et induites par l'ASM, nous devrions pouvoir exacerber l'effet de l'ASM en verger. L'efficacité de l'ASM serait augmentée en choisissant des génotypes cumulant différents QTLs et la combinaison des résistances génétiques et induites garantirait une protection significative des pommiers en vergers. Ces résultats sont donc prometteurs dans un objectif de réduction des pesticides et de protection efficace des productions. De plus, si les résistances génétiques et induites interviennent dans des voies de défenses indépendantes, alors les possibilités d'adaptation des agents pathogènes devraient être plus faibles. Les populations pathogènes, sous la pression de défenses multiples, seraient contraintes à un compromis adaptatif (Parlevliet, 2002; REX Consortium, 2016). Donc des résistances combinées et indépendantes permettraient de développer des méthodes de lutttes efficaces et durables.

b- De nouvelles stratégies et méthodologies de sélection

Un nouveau critère à sélectionner = la réceptivité aux SDP ?

La combinaison des résistances génétiques et induites par l'ASM est prometteuse pour lutter efficacement contre la tavelure et le feu bactérien en verger. Mais nous avons mis en évidence que l'efficacité de l'ASM peut varier en fonction des génotypes et notamment des résistances

génétiques. L'origine de la variabilité de l'efficacité de l'ASM reste encore à élucider et son ampleur à apprécier. Mais la réponse à l'ASM pourrait éventuellement devenir un nouveau caractère à intégrer dans les programmes de sélection.

Nous pourrions intégrer dans de nouvelles variétés la capacité de répondre à l'ASM et favoriser les interactions positives qui permettraient d'amplifier les résistances individuelles au travers de la combinaison. Il est possible que l'efficacité de chaque SDP réponde à un mécanisme différent. Il faudrait alors adapter les stratégies de sélection pour associer les couples de résistances génétiques et induites les plus efficaces pour la protection des vergers. Avec l'accumulation des connaissances sur les mécanismes impliqués dans ces résistances, nous pourrions développer un modèle de prédiction des interactivités, qui serait utilisé comme outil d'aide à la décision pour optimiser les croisements et la sélection de nouvelles variétés.

Réduire les intervalles de confiance des QTLs de résistance pour renforcer la SAM sur le pommier

Comme rappelé dans le chapitre I, la SAM est une approche qui utilise les informations de marqueurs moléculaire pour réduire les temps de sélection de nouvelles variétés. Concernant les résistances génétiques, ces données moléculaires sont disponibles pour un ensemble de gènes majeurs et de QTLs de résistance (Patocchi et al., 2020; Peil et al., 2020). Cependant les intervalles de confiance des QTLs, considérés comme plus durables (Parlevliet, 2002; Brun et al., 2010; Pilet-Nayel et al., 2017) donc intéressants à sélectionner, sont souvent larges. Le risque est donc de ne pas pouvoir identifier des doubles recombinaisons au sein de la zone ou de sélectionner des portions génomiques trop larges donc inintéressantes. Il est donc nécessaire de réduire les intervalles de confiance des QTLs de résistance pour pouvoir développer la SAM sur le pommier.

Un certain nombre d'études de cartographie ont été menées sur le pommier pour détecter des QTLs de résistance à la tavelure et au feu bactérien (Durel et al., 2003, 2009; Calenge et al., 2004, 2005; Gessler and Patocchi, 2006; Khan et al., 2006; Soufflet-Freslon et al., 2008; Le Roux et al., 2010; Bus et al., 2011; Lê Van et al., 2012; Soriano et al., 2014; Wöhner et al., 2014; Emeriewen et al., 2017). L'intégration de ces résultats a permis de déterminer les origines génétiques des principaux QTLs et préciser leurs intervalles de confiance. Cependant dans ce manuscrit nous avons vu que malgré la réduction des intervalles, plus d'une centaine de gènes

les composent. Théoriquement, pour réduire les intervalles de confiance des QTLs, il faudrait augmenter le nombre de marqueurs disponibles et surtout le nombre d'évènements de recombinaison dans l'intervalle de confiance des QTLs.

Jusqu'à récemment, les marqueurs SSR ont été utilisés pour suivre la transmission de caractère d'intérêt. Cependant le nombre de marqueur SSR disponible est souvent limité et les technologies de génotypages ne sont pas aussi haut-débit que celles développées pour les marqueurs SNP. Pour augmenter le nombre de marqueurs informatifs disponibles dans les régions des QTLs, une des stratégies est de passer aux marqueurs SNP comme réalisée dans le cadre du nouveau projet européen INVITE. Dans cette étude le problème du nombre de marqueurs disponibles n'était pas limitant (carte haute densité).

Pour augmenter la probabilité d'évènement de recombinaison dans les intervalles des QTLs, il faudrait réaliser les détections sur des descendance d'effectif plus grand. La descendance TxF comprend 265 individus ce qui est déjà un effectif considéré comme très grand pour une descendance de cartographie chez le pommier. L'utilisation actuelle des pedigree reconstruits grâce aux marqueurs SNP (Muranty et al., 2020) permet de mettre en œuvre de nouvelles stratégies pour affiner les intervalles en s'appuyant sur la transmission des haploblocks au sein de pedigree très large et en analysant les évènements de recombinaison à l'échelle de l'ensemble du pedigree (Durel et al., 2019 ; Peace et al., 2020 ; Howard et al., 2020).

En réduisant les intervalles de confiance de tous les QTLs de résistance détectée, nous pourrions créer une collection de variétés qui cumule différentes combinaisons de QTLs. La combinaison, ou pyramidage des QTLs, a été montrée comme efficace et potentiellement durable pour la protection des variétés (Laloi et al., 2017 ; Lasserre-Zuber et al., 2018). En associant dans les vergers des variétés qui combinent différents pyramidages de QTLs, nous pourrions limiter le développement de populations pathogènes virulentes.

c- Vers la gestion durable de la santé des pommiers

Avant de pouvoir utiliser la combinaison des résistances génétiques et induites par les SDP dans les itinéraires techniques ou les programmes de sélection, des recherches complémentaires sont nécessaires. En effet comprendre comment fonctionne l'interaction et

quelle est la durabilité de la combinaison des résistances sont des prérequis nécessaires pour envisager ces résistances comme des méthodes alternatives de lutte.

Combiner différents leviers alternatifs à l'utilisation de produits phytopharmaceutiques

Pour comprendre l'efficacité des SDP, il est non seulement nécessaire d'identifier les mécanismes mis en place lors de la réponse à un SDP, mais aussi tous les facteurs qui pourraient influencer ces mécanismes. Pour identifier ces mécanismes, nous pourrions comparer les gènes, les métabolites ou les protéines différentiellement exprimés ou accumulés entre les traitements SDP ou Eau. Ces études ont été menées sur l'ASM et les résistances génétiques individuellement et dans ce manuscrit nous avons étudié la combinaison entre l'ASM et quelques QTLs. Il faudrait approfondir ces recherches en étudiant d'autres combinaisons : Comment varie l'efficacité de l'ASM en présence d'autres QTLs de résistance ? Les principaux QTLs de résistance à la tavelure, qT1, qF11, qF17 et au feu bactérien qF7 interagissent-ils avec d'autres SDP ?

La variation la plus importante de l'efficacité des SDP intervient en vergers. Il est donc essentiel d'étudier la variabilité de l'efficacité des SDP au travers d'expérimentation réalisées en vergers pour intégrer la complexité de l'environnement naturel. L'avantage des tests en serre ou chambre de culture est qu'il est possible de contrôler la plupart des facteurs affectant les greffes et donc la résistance (lumière, humidité, température, ...). Cette méthode d'expérimentation permet de découper la complexité de l'efficacité des résistances en découpant chaque variable, une par une. La limite de cette méthode est qu'il est difficile de reproduire la totalité de la complexité d'un verger dans des conditions contrôlées, sachant qu'on ne connaît pas l'ensemble des facteurs modulant les résistances. Les résistances génétiques et/ou induites sont potentiellement modulées par l'état physiologique de la plante lui-même dépendant des conditions environnementales, des caractéristiques physico-chimiques du sol, des intrants (engrais, autres traitements ...) nécessaires à la culture des pommiers en vergers, ou encore du microbiote de chaque plante.

Pour faire suite à cette thèse, il faudrait donc développer les recherches sur l'interaction entre les résistances génétiques et induites par l'ASM en vergers. Ceci va pouvoir se réaliser grâce à la mise en place d'un verger expérimental en 2021 permettant d'étudier la combinaison des classes de QTLs (sansQTL, T1, F11F17 et T1F11F17) avec l'ASM en condition naturelle. Les

greffes ont été réalisées cet été ; les jeunes scions seront implantés durant l'hiver 2021-2022 pour constituer le verger.

Dans l'objectif d'une protection intégrée, il serait également intéressant de tester les effets et les interactions avec d'autres leviers alternatifs à l'utilisation des produits phytopharmaceutiques. Le projet « CAP ZERO PHYTO », accepté cette année dans le cadre du Programme Prioritaire de Recherche « Cultiver et Protéger Autrement » a pour objectif d'analyser un ensemble de leviers qui, combinés, parviendraient à protéger les cultures (pommier et tomate comme espèces modèles) sans recours (ou le moins possible) aux pesticides de synthèse. Le concept d'immunité écologique a été proposé comme le fait que l'ensemble des éléments qui composent l'environnement d'une plante peut contribuer à son immunité. Ainsi les cultures à proximité, les intrants, le microbiote, les pratiques culturales, ... et tout ce qui affecte directement ou indirectement une plante peut contribuer à favoriser ou défavoriser son immunité. Comprendre l'ensemble de ce réseau à grande échelle et l'exploiter pour la protection des vergers devraient permettre de s'affranchir des traitements phytopharmaceutiques (REX Consortium, 2016). Dans le cadre du projet CAP ZERO PHYTO, plusieurs leviers seront étudiés individuellement et en combinaison dans le but d'optimiser l'immunité globale du pommier : géotypes portant plus ou moins de QTLs de résistance, différents SDP, mais également les flashes d'UV-C, les plantes de service et les apports d'azote. L'ensemble de mon travail de thèse aura posé une partie des bases de ce nouveau projet en matière de matériel génétique et d'interaction avec les SDP

Annexes

1- Chapitre III

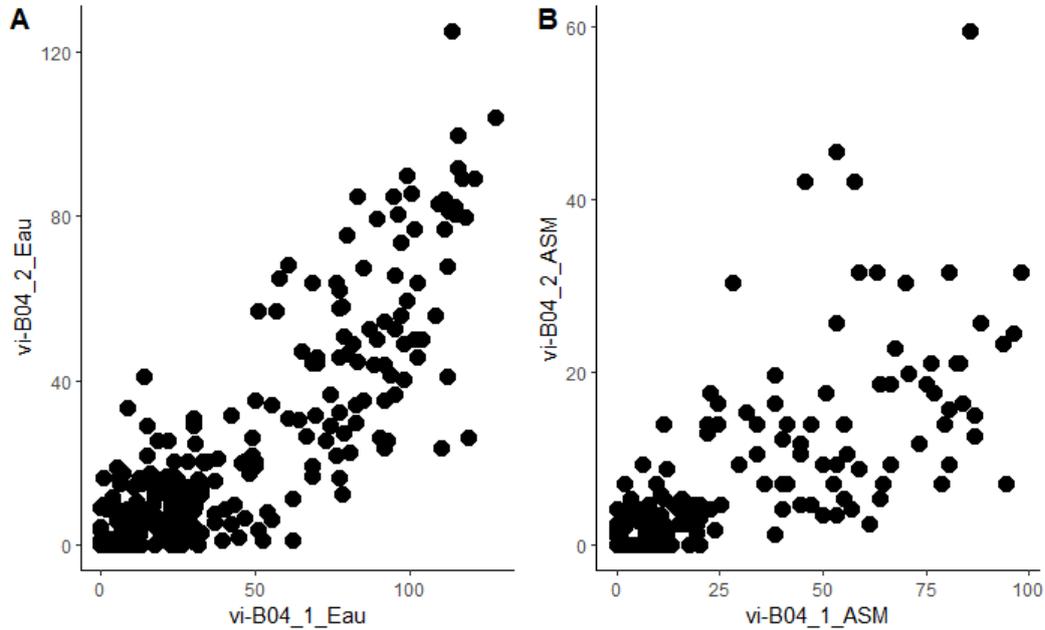


Figure S1 : Corrélations des niveaux de sensibilité des géotypes de la descendance entre les répétitions des tests Vi-B04 (Vi-B04_1 et Vi-B04_2) dans la condition témoin (A) ou après un traitement ASM (B).

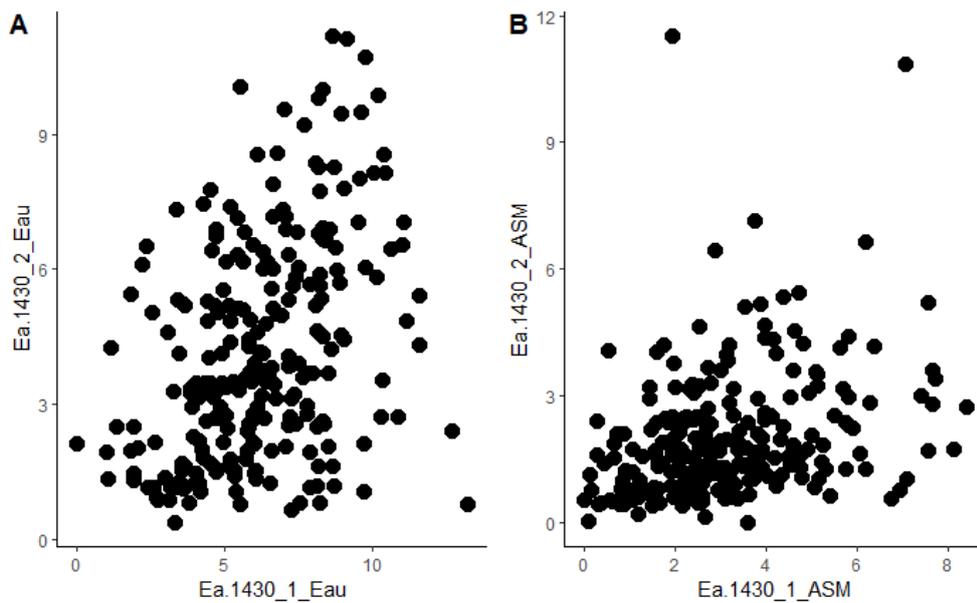


Figure S2 : Corrélations des niveaux de sensibilité des géotypes de la descendance entre les répétitions des tests Ea-1430 (Ea-1430_1 et Ea-1430_2) dans la condition témoin (A) ou après un traitement ASM (B).

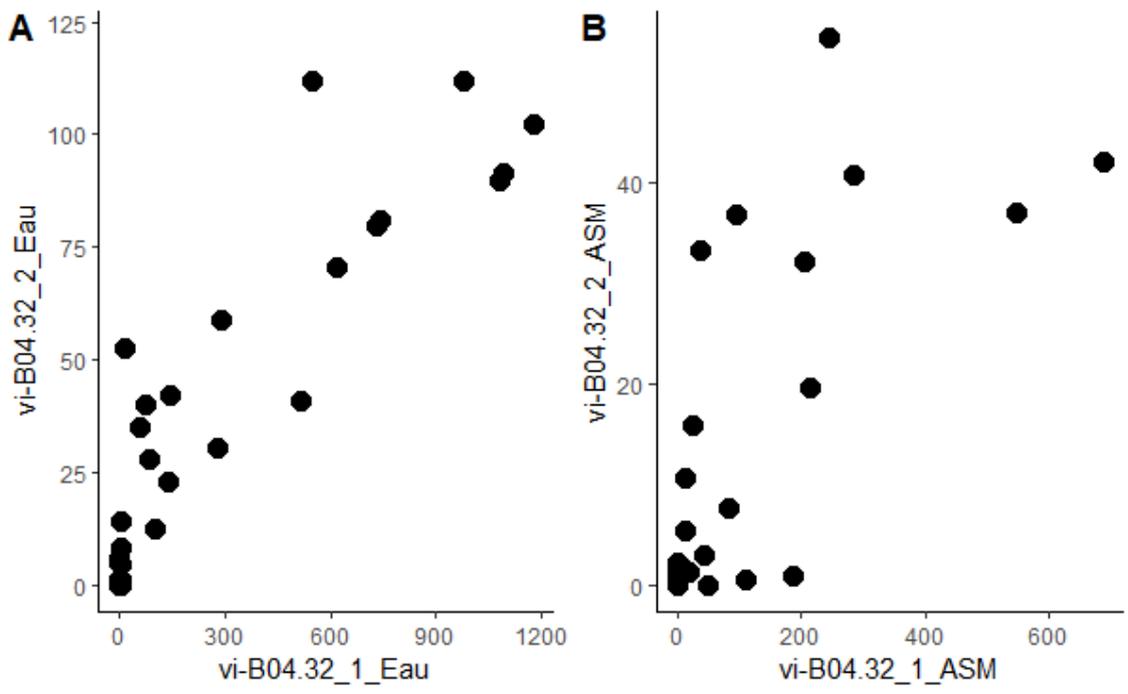


Figure S3 : Corrélations des niveaux de sensibilité des variétés de la CcE_32 entre les répétitions des tests Vi-B04.32 (Vi-B04.32_1 et Vi-B04.32_2) dans la condition témoin (A) ou après un traitement ASM (B).

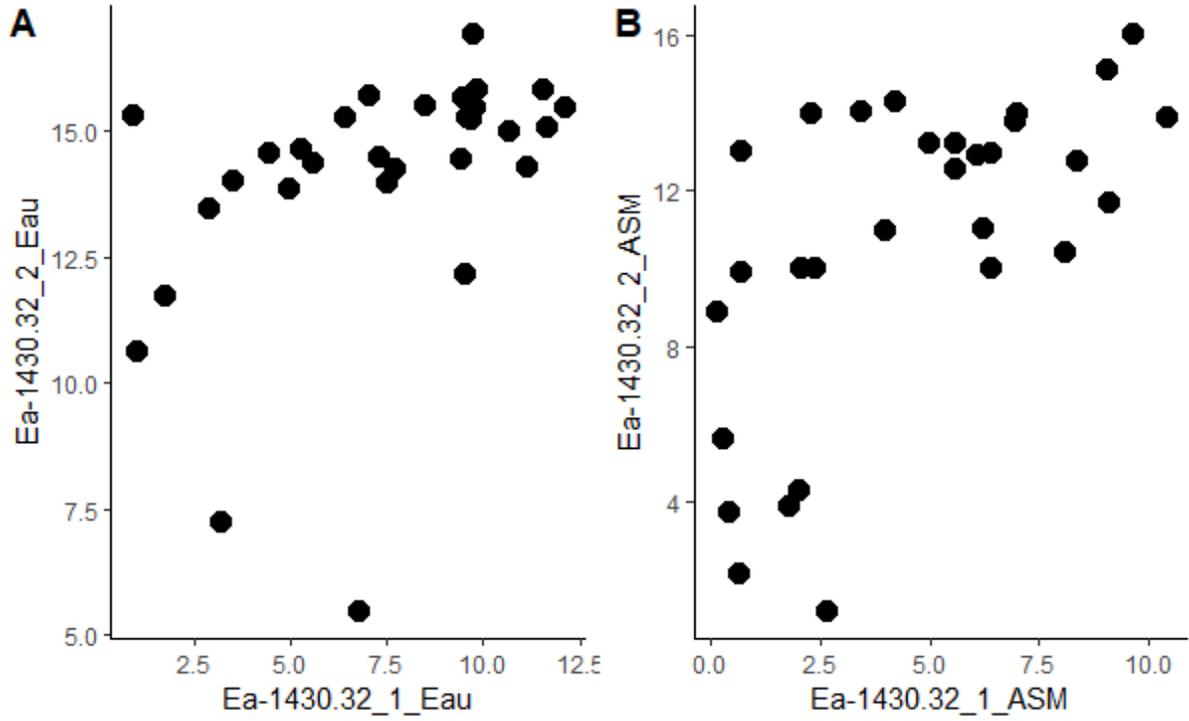


Figure S4 : Corrélations des niveaux de sensibilité des variétés de la CcE_32 entre les répétitions des tests Ea-1430.32 (Ea-1430.32_1 et Ea-1430.32_2) dans la condition témoin (A) ou après un traitement ASM (B).

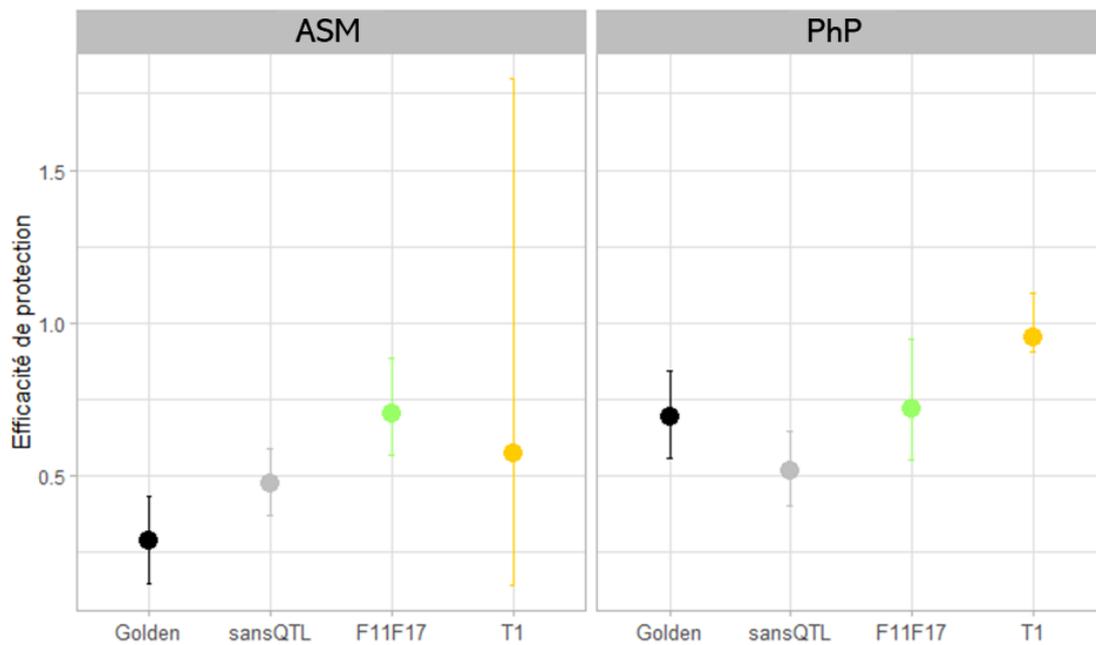


Figure S5 : Efficacités de protection de l'ASM et du PhP vis-à-vis de *Vi* (*Vi*-B04_EAPK) en fonction des classes de QTLs. Les barres représentent les intervalles de confiance, calculés par bootstrap, autour de la moyenne de l'efficacité du SDP dans chaque classe.

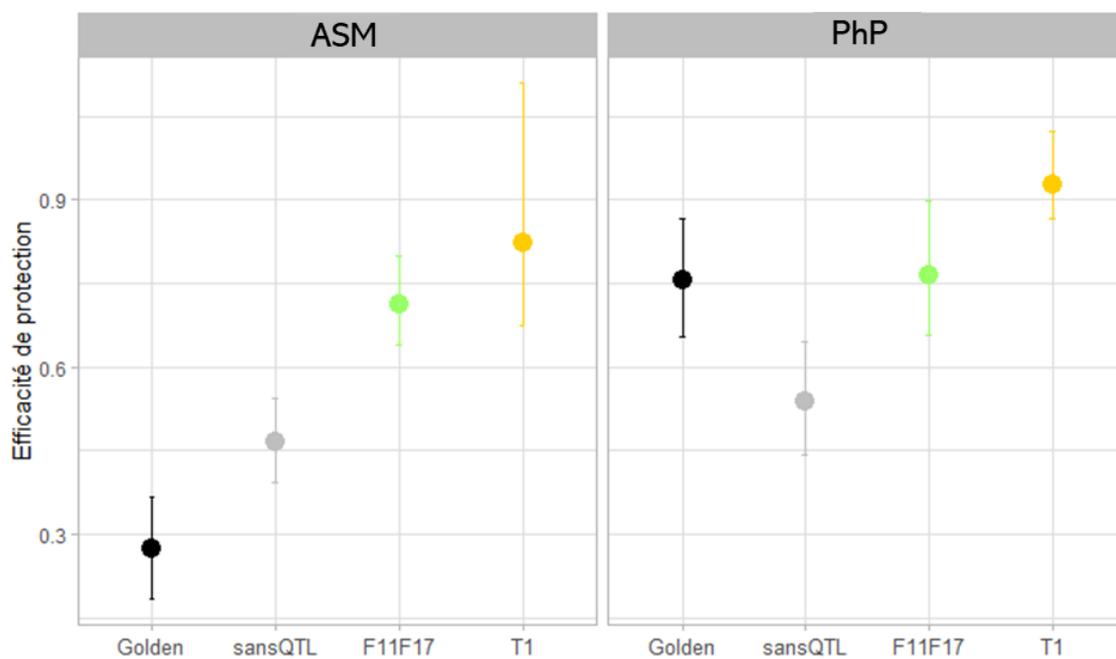


Figure S6 : Efficacités de protection de l'ASM et du PhP calculées sur l'ensemble des deux tests *Vi*-B04_EAPK et EAPC en fonction des classes de QTLs. Les barres représentent les intervalles de confiance, calculés par bootstrap, autour de la moyenne de l'efficacité du SDP dans chaque classe.

2- Chapitre IV

Tableau S1 : Liste des 90 gènes candidats dans l'intervalle du QTL qT1. Les séquences en rouge représentent les gènes *Hcrvf*.

Séquence	Position	Annotation
MD01G1172800	27476194	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1173000	27488216	receptor like protein 15
MD01G1173100	27498373	Pectin lyase-like superfamily protein
MD01G1173200	27502676	Pectin lyase-like superfamily protein
MD01G1173300	27506349	casein kinase II beta chain 2
MD01G1173400	27508856	Agnet domain-containing protein
MD01G1173500	27517067	metacaspase 1
MD01G1173700	27524108	Fe superoxide dismutase 2
MD01G1173800	27526649	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
MD01G1174000	27532687	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
MD01G1174300	27551955	SOH1 family protein
MD01G1174400	27556734	glutamate dehydrogenase 2
MD01G1174500	27560103	Chlorophyll A-B binding family protein
MD01G1174600	27574119	GRAM domain family protein
MD01G1174800	27608117	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1175000	27619738	RNA ligase/cyclic nucleotide phosphodiesterase family protein
MD01G1175200	27629886	Ribonuclease T2 family protein
MD01G1175400	27653814	Ankyrin repeat family protein
MD01G1175600	27661740	Encodes a close homolog of the Cauliflower OR (Orange) protein.
MD01G1175700	27674099	cytochrome P450
MD01G1176300	27703086	peptide met sulfoxide reductase 4
MD01G1176400	27707136	Cupredoxin superfamily protein
MD01G1176500	27721546	KAR-UP oxidoreductase 1
MD01G1176600	27726352	RAB GTPase homolog 1A
MD01G1176700	27730549	myb-like transcription factor family protein
MD01G1176900	27753420	oleosin3
MD01G1177000	27769205	ethylene responsive element binding factor 1
MD01G1177100	27783343	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
MD01G1177200	27797664	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
MD01G1177300	27800492	phosphofructokinase 4
MD01G1177400	27807051	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD01G1177500	27813076	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
MD01G1177600	27817923	ubiquinol-cytochrome C chaperone family protein
MD01G1177700	27821997	HAD superfamily
MD01G1177800	27828852	Protein kinase superfamily protein
MD01G1177900	27832626	U-box domain-containing protein kinase family protein
MD01G1178000	27838697	Diacylglycerol kinase family protein
MD01G1178100	27845860	myb-like HTH transcriptional regulator family protein
MD01G1178200	27847067	small G protein family protein / RhoGAP family protein
MD01G1178300	27858427	Major facilitator superfamily protein
MD01G1178400	27860758	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
MD01G1178700	27871991	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1178900	27878764	receptor like protein 1
MD01G1179100	27883706	Agnet domain-containing protein
MD01G1179200	27887220	Pectin lyase-like superfamily protein
MD01G1179300	27907148	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1179400	27917949	Major facilitator superfamily protein
MD01G1179500	27919872	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein

MD01G1179700	27934168	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1179800	27949555	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1180000	27957636	Major facilitator superfamily protein
MD01G1180100	27965860	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
MD01G1180200	27969755	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
MD01G1180500	27981391	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1180600	27991803	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family protein
MD01G1180700	27997009	SWITCH1
MD01G1180900	28007834	Cysteine proteinases superfamily protein
MD01G1181000	28016624	Lipase/lipoxygenase
MD01G1181100	28020900	disease resistance family protein / LRR family protein
MD01G1181200	28027280	splicing factor-related
MD01G1181300	28033325	RNA polymerase III RPC4
MD01G1181600	28046442	Ribosomal protein L23/L15e family protein
MD01G1181700	28058104	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
MD01G1181800	28075535	F-box family protein
MD01G1182000	28085892	C2H2-like zinc finger protein
MD01G1182100	28092561	RNI-like superfamily protein
MD01G1182200	28097024	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
MD01G1182300	28104180	structural maintenance of chromosomes 2
MD01G1182400	28111538	tonoplast intrinsic protein 5
MD01G1182500	28117262	PLAC8 family protein
MD01G1182600	28120533	peroxin 11B
MD01G1182700	28122113	LUC7 N terminus domain-containing protein
MD01G1182800	28127908	conserved oligomeric Golgi complex component-related/COG complex component-related
MD01G1182900	28162243	peptide met sulfoxide reductase 4
MD01G1183100	28194578	Rab5-interacting family protein
MD01G1183300	28212028	E2F target gene 1
MD01G1183400	28252287	heavy metal atpase 2
MD01G1183500	28265621	DNA photolyases
MD01G1183600	28268989	GDA1/CD39 nucleoside phosphatase family protein
MD01G1183700	28290027	heavy metal atpase 2
MD01G1183800	28300901	DNA photolyases
MD01G1183900	28302520	DNA photolyases
MD01G1184000	28325290	heavy metal atpase 2
MD01G1184300	28363880	heavy metal atpase 2
MD01G1184400	28371587	DNA photolyases
MD01G1184500	28377155	low psii accumulation2
MD01G1184600	28384993	EXORDIUM like 3
MD01G1184700	28401105	Ribosomal protein S10p/S20e family protein
MD01G1184800	28403278	nucleotide-sensitive chloride conductance regulator (ICln) family protein
MD01G1184900	28420212	Leucine-rich repeat protein kinase family protein

Tableau S2 : Liste des 188 gènes candidats dans l'intervalle du QTL qF11.

Séquence	Position	Annotation
MD11G1004000	334453	Mitochondrial substrate carrier family protein
MD11G1004100	351846	Peroxidase superfamily protein
MD11G1004300	372929	Ribosomal protein L1p/L10e family
MD11G1004600	429304	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD11G1004700	433905	F1F0-ATPase inhibitor protein
MD11G1004800	438527	alcohol dehydrogenase 1
MD11G1004900	453486	Mitochondrial substrate carrier family protein
MD11G1005100	463833	tubulin alpha-5
MD11G1005200	468263	related to AP2 11
MD11G1005300	470572	ARM repeat superfamily protein
MD11G1005500	501453	ARM repeat superfamily protein
MD11G1005800	539541	ARM repeat superfamily protein
MD11G1006000	573654	Peptidyl-tRNA hydrolase family protein
MD11G1006100	580098	cytochrome P450
MD11G1006300	597544	HMG (high mobility group) box protein
MD11G1006400	615608	Peptidyl-tRNA hydrolase family protein
MD11G1006500	619660	myb domain protein 5
MD11G1006700	630065	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
MD11G1006800	636073	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD11G1006900	641509	F-box family protein
MD11G1007000	652070	Peptidyl-tRNA hydrolase family protein
MD11G1007100	654163	topoisomerase II
MD11G1007300	661883	Peptidyl-tRNA hydrolase family protein
MD11G1007400	663300	Peptidyl-tRNA hydrolase family protein
MD11G1007500	672377	myb domain protein 5
MD11G1007700	683690	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
MD11G1007800	689344	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD11G1007900	695811	Putative lysine decarboxylase family protein
MD11G1008000	700057	calcium ion binding
MD11G1008100	702994	ACD1-like
MD11G1008200	706960	ACD1-like
MD11G1008300	712375	calmodulin-binding family protein
MD11G1008600	730529	TBP-associated factor 7
MD11G1008700	733930	SC35-like splicing factor 30A
MD11G1008800	735164	SC35-like splicing factor 30A
MD11G1008900	739599	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
MD11G1009100	748616	Transposon Ty3-G Gag-Pol polyprotein
MD11G1009200	757758	acyl-activating enzyme 18
MD11G1009300	760562	acyl-activating enzyme 18
MD11G1009400	761999	acyl-activating enzyme 18
MD11G1009500	763748	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
MD11G1009700	769877	Amino acid permease family protein
MD11G1009900	775342	Amino acid permease family protein
MD11G1010000	777618	Amino acid permease family protein
MD11G1010200	783252	PHYTOENE SYNTHASE
MD11G1010300	785310	PHYTOENE SYNTHASE
MD11G1010500	792262	PHYTOENE SYNTHASE
MD11G1010600	795712	protein phosphatase 2A-3
MD11G1010700	805730	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
MD11G1011100	828475	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
MD11G1011200	835240	long chain base2
MD11G1011300	838712	long chain base2
MD11G1011400	841416	NB-ARC domain-containing disease resistance protein

MD11G1011600	849683	transferases
MD11G1011700	854782	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1012200	866532	BR-signaling kinase 1
MD11G1012400	912154	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
MD11G1012500	917096	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
MD11G1012800	932685	chromomethylase 3
MD11G1012900	948429	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
MD11G1013000	971607	chromomethylase 3
MD11G1013100	990337	chromomethylase 3
MD11G1013200	991477	chromomethylase 3
MD11G1013500	1066252	Protein precursor Ycf15
MD11G1013700	1081296	chromomethylase 3
MD11G1013800	1087600	mRNA capping enzyme family protein
MD11G1014000	1115012	BED zinc finger
MD11G1014200	1141862	Protein kinase family protein
MD11G1014300	1148335	CCAAT-binding factor
MD11G1014400	1148686	CCAAT-binding factor
MD11G1014500	1153391	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein
MD11G1014600	1154826	Cation efflux family protein
MD11G1014800	1179123	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
MD11G1014900	1183310	seven in absentia of Arabidopsis 2
MD11G1015100	1197425	10-formyltetrahydrofolate synthetase
MD11G1015300	1212949	peroxidase 2
MD11G1015400	1220317	Peroxidase superfamily protein
MD11G1015500	1227004	Peroxidase superfamily protein
MD11G1015600	1233793	Thioredoxin superfamily protein
MD11G1015700	1247514	Peroxidase superfamily protein
MD11G1015800	1252488	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein
MD11G1015900	1256879	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) plant phosphoribosyltransferase family protein
MD11G1016000	1259381	PRLI-interacting factor
MD11G1016100	1265333	glucan synthase-like 10
MD11G1016200	1287011	glucan synthase-like 12
MD11G1016300	1305961	ARM repeat superfamily protein
MD11G1016700	1346486	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
MD11G1016800	1360064	Noc2p family
MD11G1017100	1384760	KH domain-containing protein / zinc finger (CCCH type) family protein
MD11G1017200	1390561	AP2/B3 transcription factor family protein
MD11G1017300	1392309	Major facilitator superfamily protein
MD11G1017400	1397227	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
MD11G1017500	1401307	Nse4
MD11G1017600	1411279	DNA-binding bromodomain-containing protein
MD11G1017800	1418633	receptor like protein 2
MD11G1017900	1424299	receptor like protein 3
MD11G1018100	1430282	receptor like protein 3
MD11G1018200	1434896	DNA-binding bromodomain-containing protein
MD11G1018300	1439432	receptor like protein 3
MD11G1018400	1583638	receptor like protein 3
MD11G1018500	1588285	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
MD11G1018800	1610715	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
MD11G1018900	1620219	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
MD11G1019000	1631169	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
MD11G1019200	1654496	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
MD11G1019300	1660602	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
MD11G1019400	1664268	WUS-interacting protein 2
MD11G1019500	1674911	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein

MD11G1019600	1676836	Emsy N Terminus (ENT)/ plant Tudor-like domains-containing protein
MD11G1019800	1687459	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1019900	1710030	Glycolipid transfer protein (GLTP) family protein
MD11G1020100	1730970	Emsy N Terminus (ENT)/ plant Tudor-like domains-containing protein
MD11G1020200	1743419	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1020300	1755096	Glycolipid transfer protein (GLTP) family protein
MD11G1020400	1758577	Glycolipid transfer protein (GLTP) family protein
MD11G1020500	1779043	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1020600	1795031	Glycolipid transfer protein (GLTP) family protein
MD11G1020800	1808808	lipoyltransferase 2
MD11G1021100	1820990	receptor-like protein kinase 1
MD11G1021300	1833349	receptor-like protein kinase 1
MD11G1021400	1848039	receptor-like protein kinase 1
MD11G1021500	1852806	receptor-like protein kinase 1
MD11G1021800	1892598	carbamoyl phosphate synthetase A
MD11G1021900	1900033	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
MD11G1022000	1901750	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
MD11G1022200	1909890	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
MD11G1022300	1911627	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
MD11G1022400	1921853	ETHYLENE-INSENSITIVE3-like 3
MD11G1022500	1935578	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
MD11G1022600	1968853	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 10
MD11G1022700	1983736	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) plant phosphoribosyltransferase family protein
MD11G1022800	1995386	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
MD11G1023100	2013402	lipoxygenase 2
MD11G1023200	2023331	beta glucosidase 17
MD11G1023400	2029620	beta glucosidase 24
MD11G1023600	2037400	Ubiquitin-specific protease family C19-related protein
MD11G1023700	2048237	beta glucosidase 13
MD11G1023900	2054793	beta glucosidase 13
MD11G1024000	2072714	beta glucosidase 14
MD11G1024100	2084681	beta glucosidase 13
MD11G1024300	2112148	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
MD11G1024500	2123878	receptor-like protein kinase 1
MD11G1024600	2126733	receptor-like protein kinase 1
MD11G1024700	2130330	receptor-like protein kinase 1
MD11G1024800	2155951	receptor-like protein kinase 1
MD11G1024900	2163808	receptor-like protein kinase 1
MD11G1025200	2192058	receptor-like protein kinase 1
MD11G1025300	2203481	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein
MD11G1025400	2241231	Amino acid dehydrogenase family protein
MD11G1025500	2244651	receptor-like protein kinase 1
MD11G1025600	2249515	receptor-like protein kinase 1
MD11G1025800	2278264	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
MD11G1026100	2327365	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein
MD11G1026200	2332450	receptor-like protein kinase 1
MD11G1026400	2337359	receptor-like protein kinase 1
MD11G1026500	2355834	receptor-like protein kinase 1
MD11G1026600	2359882	receptor-like protein kinase 1
MD11G1026700	2371881	receptor-like protein kinase 1
MD11G1026800	2372922	receptor-like protein kinase 1
MD11G1026900	2375254	Histone superfamily protein
MD11G1027000	2377177	Cyclin B1
MD11G1027100	2379936	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
MD11G1027200	2386512	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein

MD11G1027300	2388060	receptor-like protein kinase 1
MD11G1027400	2390782	Histone superfamily protein
MD11G1027500	2394650	beta glucosidase 17
MD11G1027600	2407205	Histone superfamily protein
MD11G1027700	2412963	beta glucosidase 12
MD11G1028100	2449296	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
MD11G1028200	2470949	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
MD11G1028400	2488731	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
MD11G1028500	2495879	Putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)
MD11G1028600	2505502	MIF4G domain-containing protein / MA3 domain-containing protein
MD11G1028700	2519200	Protein kinase superfamily protein
MD11G1028800	2541395	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
MD11G1028900	2550997	MSF1-like family protein
MD11G1029000	2554400	A20/AN1-like zinc finger family protein
MD11G1029100	2557273	A20/AN1-like zinc finger family protein
MD11G1029300	2575098	transmembrane protein G1P-related 1
MD11G1029400	2577049	ZIP metal ion transporter family
MD11G1029500	2590820	C2H2-type zinc finger family protein
MD11G1029600	2597446	outer envelope protein of 80 kDa
MD11G1029800	2618565	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1029900	2621010	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
MD11G1030100	2626592	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein
MD11G1030300	2637457	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1030400	2656464	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1030500	2664259	NB-ARC domain-containing disease resistance protein

Tableau S3 : Liste des 110 gènes candidats dans l'intervalle du QTL qF17.

Séquence	Position	Annotation
MD17G1089100	7322015	Protein with RNI-like/FBD-like domains
MD17G1089200	7327396	F-box/RNI-like superfamily protein
MD17G1089300	7337826	RNI-like superfamily protein
MD17G1089400	7346825	FBD
MD17G1089500	7350280	F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein
MD17G1089600	7355254	F-box/RNI-like superfamily protein
MD17G1089700	7361577	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
MD17G1089900	7373850	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
MD17G1090000	7421247	terpene synthase-like sequence-1
MD17G1090100	7443256	terpene synthase-like sequence-1
MD17G1090300	7491579	S-locus lectin protein kinase family protein
MD17G1090400	7526215	terpene synthase 03
MD17G1090600	7536435	Phototropic-responsive NPH3 family protein
MD17G1090800	7544673	GRAS family transcription factor
MD17G1091000	7563670	SET domain protein 2
MD17G1091100	7594483	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
MD17G1091300	7617046	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
MD17G1091400	7668442	formin 3
MD17G1091600	7675399	beta-amylase 6
MD17G1091700	7677742	beta-amylase 5
MD17G1091800	7698219	uclacyanin 1
MD17G1091900	7702460	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 25
MD17G1092200	7723204	B-box type zinc finger family protein
MD17G1092400	7730960	Peroxidase superfamily protein
MD17G1092500	7770306	EXS (ERD1/XPR1/SYG1) family protein
MD17G1092600	7776186	cyclin p2
MD17G1092700	7777832	peroxin 22
MD17G1092800	7789224	TraB family protein
MD17G1093000	7795400	TraB family protein
MD17G1093600	7841205	Peroxidase superfamily protein
MD17G1093700	7860552	Peroxidase superfamily protein
MD17G1094100	7890778	Translation initiation factor SUI1 family protein
MD17G1094300	7930647	isocitrate lyase
MD17G1094400	7952582	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family
MD17G1095000	8045867	homeodomain GLABROUS 2
MD17G1095100	8073541	homeodomain GLABROUS 2
MD17G1095200	8077033	Transmembrane protein 97
MD17G1095300	8079199	Transmembrane protein 97
MD17G1095500	8083775	Transmembrane protein 97
MD17G1095600	8093267	Transmembrane protein 97
MD17G1095700	8095558	Transmembrane protein 97
MD17G1095800	8097308	Transmembrane protein 97
MD17G1096000	8102376	Ras-related small GTP-binding family protein
MD17G1096100	8113606	glutamate receptor 3.4
MD17G1096200	8125432	glutamate receptor 5
MD17G1096300	8131157	Ribosomal protein L6 family
MD17G1096400	8139923	MATE efflux family protein
MD17G1096700	8193005	aconitase 3
MD17G1096800	8214957	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
MD17G1097000	8222044	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
MD17G1097300	8240182	Signal recognition particle
MD17G1097400	8241203	Signal recognition particle
MD17G1097500	8257162	Galactosyltransferase family protein
MD17G1097700	8270735	NADP-malic enzyme 4
MD17G1097800	8278017	Ubiquitin-like superfamily protein
MD17G1098000	8341548	APS reductase 1
MD17G1098100	8343658	small and basic intrinsic protein 1A

MD17G1098300	8355194	SKU5 similar 5
MD17G1098500	8363471	Helicase protein with RING/U-box domain
MD17G1098600	8370623	Dihydrolipoamide succinyltransferase
MD17G1098700	8381923	B-cell receptor-associated 31-like
MD17G1098800	8387130	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 18
MD17G1098900	8394267	aspartic proteinase A1
MD17G1099000	8402127	WRKY family transcription factor
MD17G1099100	8419022	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD17G1099200	8429422	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD17G1099300	8434086	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
MD17G1099400	8436219	cellulose synthase-like B4
MD17G1099500	8453194	cellulose synthase-like B3
MD17G1099600	8456271	cellulose synthase-like B3
MD17G1099800	8470013	cellulose synthase-like B3
MD17G1100000	8510660	UDP-glucosyl transferase 73B3
MD17G1100100	8514493	dentin sialophosphoprotein-related
MD17G1100200	8515435	dentin sialophosphoprotein-related
MD17G1100300	8518916	UDP-glucosyl transferase 73B3
MD17G1100500	8534435	dentin sialophosphoprotein-related
MD17G1100800	8543616	hydroperoxide lyase 1
MD17G1101100	8562251	Ankyrin repeat family protein
MD17G1101400	8609412	Ankyrin repeat family protein
MD17G1101500	8619744	ERD (early-responsive to dehydration stress) family protein
MD17G1101600	8628356	Ubiquitin fusion degradation UFD1 family protein
MD17G1102000	8656942	RNAse II-like 1
MD17G1102100	8664543	chitin elicitor receptor kinase 1
MD17G1102300	8703120	RmlC-like cupins superfamily protein
MD17G1102400	8705521	Protein phosphatase 2A regulatory B subunit family protein
MD17G1102500	8710030	PHD finger family protein / bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein
MD17G1102600	8723554	KNOX/ELK homeobox transcription factor
MD17G1102700	8728930	serine/threonine protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B prime gamma
MD17G1102800	8732753	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
MD17G1102900	8742116	F-box and associated interaction domains-containing protein
MD17G1103000	8745481	Major facilitator superfamily protein
MD17G1103100	8762153	glycosyl hydrolase 9B8
MD17G1103300	8775534	Major facilitator superfamily protein
MD17G1103400	8780576	Nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
MD17G1103900	8801640	small ubiquitin-like modifier 1
MD17G1104000	8805390	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
MD17G1104200	8823704	Ankyrin repeat family protein
MD17G1104500	8880377	Ankyrin repeat family protein
MD17G1104600	8894928	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
MD17G1104700	8896489	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
MD17G1104800	8897495	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
MD17G1104900	8902594	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
MD17G1105000	8907217	Cytochrome c oxidase biogenesis protein Cmc1-like
MD17G1105100	8914153	general regulatory factor 3
MD17G1105200	8936686	ARM repeat superfamily protein
MD17G1105400	8941577	RNAse E/G-like
MD17G1105500	8942449	RNAse E/G-like
MD17G1105600	8942881	RNAse E/G-like
MD17G1105700	8954855	RING/U-box superfamily protein
MD17G1105800	8991224	fatty acid desaturase 5

Tableau S4 : Liste des 139 gènes candidats dans l'intervalle du QTL qF7.

Séquence	Position	Annotation
MD07G1248800	31800459	phosphofructokinase 4
MD07G1248900	31802062	phosphofructokinase 4
MD07G1249000	31802638	phosphofructokinase 4
MD07G1249100	31804054	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD07G1249200	31811662	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
MD07G1249300	31817246	ARM repeat superfamily protein
MD07G1249400	31832282	ubiquinol-cytochrome C chaperone family protein
MD07G1249500	31836291	HAD superfamily
MD07G1249600	31842381	Protein kinase superfamily protein
MD07G1249700	31853818	U-box domain-containing protein kinase family protei
MD07G1249800	31865550	U-box domain-containing protein kinase family protei
MD07G1249900	31870048	DERLIN-1
MD07G1250000	31876801	Ctr copper transporter family
MD07G1250200	31899833	Diacylglycerol kinase family protein
MD07G1250300	31901824	N-terminal nucleophile aminohydrolases (Ntn hydrolas
MD07G1250400	31906183	small G protein family protein / RhoGAP family prote
MD07G1250500	31911402	Major facilitator superfamily protein
MD07G1250600	31917802	expansin B2
MD07G1250700	31921118	expansin B2
MD07G1250800	31925443	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family
MD07G1251000	31936132	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family
MD07G1251100	31940910	SWITCH1
MD07G1251200	31948274	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
MD07G1251300	31953045	splicing factor-related
MD07G1251400	31959376	RNA polymerase III RPC4
MD07G1251500	31962679	Uncharacterised conserved protein (UCP012943)
MD07G1251600	31972128	Uncharacterised conserved protein (UCP012943)
MD07G1251900	31992960	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
MD07G1252200	32009653	C2H2-like zinc finger protein
MD07G1252300	32015513	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases
MD07G1252400	32026644	RNI-like superfamily protein
MD07G1252500	32029544	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases
MD07G1252600	32034767	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases
MD07G1252700	32037822	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
MD07G1252800	32041998	structural maintenance of chromosomes 2
MD07G1252900	32049183	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases
MD07G1253000	32054429	tonoplast intrinsic protein 5
MD07G1253100	32061189	PLAC8 family protein
MD07G1253200	32065186	PLAC8 family protein
MD07G1253300	32076671	peroxin 11B
MD07G1253500	32089828	LUC7 N terminus domain-containing protein
MD07G1253600	32094418	conserved oligomeric Golgi complex component-related
MD07G1253700	32096298	conserved oligomeric Golgi complex component-related
MD07G1253800	32097833	mitochondrion-localized small heat shock protein 23.
MD07G1253900	32105995	phosphate starvation-induced gene 3
MD07G1254100	32114838	RPM1 interacting protein 2
MD07G1254500	32184709	Glycosyl hydrolases family 32 protein
MD07G1254600	32193765	Cupredoxin superfamily protein
MD07G1254700	32201658	NAC 007
MD07G1254800	32202401	NAC 007
MD07G1255000	32220370	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor supe
MD07G1255200	32235444	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
MD07G1255300	32243997	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
MD07G1255400	32260788	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor supe
MD07G1255500	32262659	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor supe
MD07G1255600	32274076	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor supe
MD07G1255800	32284234	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor supe

MD07G1255900	32289481	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily prot
MD07G1256000	32289883	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily prot
MD07G1256100	32290839	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases
MD07G1256200	32297236	myb domain protein 42
MD07G1256300	32301319	AGC (cAMP-dependent
MD07G1256400	32311678	Zincin-like metalloproteases family protein
MD07G1256600	32320489	low psii accumulation2
MD07G1256800	32339906	UDP-D-glucuronate 4-epimerase 3
MD07G1256900	32341503	Ribosomal protein S10p/S20e family protein
MD07G1257000	32344626	nucleotide-sensitive chloride conductance regulator
MD07G1257100	32348459	ribosomal protein S13A
MD07G1257200	32357206	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
MD07G1257400	32368433	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associate
MD07G1257600	32383973	FK506 BINDING PROTEIN 53
MD07G1257700	32388694	rRNA processing protein-related
MD07G1257800	32395883	AT hook motif DNA-binding family protein
MD07G1257900	32400199	Microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family p
MD07G1258000	32406377	mitotic phosphoprotein N' end (MPPN) family protein
MD07G1258100	32408940	TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 18
MD07G1258300	32424222	cleavage and polyadenylation specificity factor 160
MD07G1258500	32452126	A20/AN1-like zinc finger family protein
MD07G1258600	32480136	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD07G1258700	32487816	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD07G1258800	32489583	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD07G1258900	32498174	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD07G1259000	32502297	Cell cycle regulated microtubule associated protein
MD07G1259100	32502623	Cell cycle regulated microtubule associated protein
MD07G1259200	32525935	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD07G1259300	32556073	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 8
MD07G1259400	32565190	Cell cycle regulated microtubule associated protein
MD07G1259500	32570993	ERECTA-like 1
MD07G1259600	32585539	protein binding
MD07G1259700	32588683	K+ efflux antiporter 5
MD07G1259800	32602139	Embryo-specific protein 3
MD07G1259900	32604735	DEAD box RNA helicase (PRH75)
MD07G1260000	32610062	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
MD07G1260100	32614019	Endomembrane protein 70 protein family
MD07G1260200	32622322	DEAD box RNA helicase (PRH75)
MD07G1260300	32630446	DEAD box RNA helicase (PRH75)
MD07G1260400	32632191	DEAD box RNA helicase (PRH75)
MD07G1260500	32634991	Peptidase family M48 family protein
MD07G1260700	32648906	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
MD07G1260800	32652329	subtilase 1.3
MD07G1261100	32679484	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
MD07G1261200	32683856	DEAD box RNA helicase (PRH75)
MD07G1261300	32689564	DEAD box RNA helicase (PRH75)
MD07G1261400	32700078	Peptidase family M48 family protein
MD07G1261600	32724435	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) famil
MD07G1261700	32759653	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily prot
MD07G1261900	33135037	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family
MD07G1262100	33145855	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family
MD07G1262300	33159882	GroES-like zinc-binding alcohol dehydrogenase family
MD07G1262400	33166446	zinc finger WD40 repeat protein 1
MD07G1262500	33176795	phosphoenolpyruvate carboxylase-related kinase 1
MD07G1262600	33182060	non-intrinsic ABC protein 8
MD07G1262700	33188284	Per1-like family protein
MD07G1262800	33191816	valyl-tRNA synthetase / valine--tRNA ligase (VALRS)
MD07G1262900	33199100	C-repeat-binding factor 4
MD07G1263100	33212826	Lactate/malate dehydrogenase family protein
MD07G1263200	33233379	Integrase-type DNA-binding superfamily protein

MD07G1263300	33249502	TraB family protein
MD07G1263400	33254746	response regulator 2
MD07G1263500	33261992	LOB domain-containing protein 24
MD07G1263600	33262995	MATE efflux family protein
MD07G1263700	33263588	MATE efflux family protein
MD07G1263800	33264218	MATE efflux family protein
MD07G1263900	33264569	MATE efflux family protein
MD07G1264000	33266574	arginine/serine-rich splicing factor 35
MD07G1264100	33280632	MATE efflux family protein
MD07G1264300	33315224	BCL-2-associated athanogene 1
MD07G1264500	33331866	Dihydrodipicolinate reductase
MD07G1264600	33335128	SEUSS-like 2
MD07G1264700	33348047	SEUSS-like 2
MD07G1264900	33370553	F-box family protein with a domain of unknown functi
MD07G1265000	33382301	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases
MD07G1265200	33386661	IQ-domain 23
MD07G1265400	33392417	RHOMBOID-like protein 3
MD07G1265600	33397642	RHOMBOID-like protein 3
MD07G1265700	33418803	TARGET OF MONOPTEROS 6
MD07G1265800	33420467	Calcium-binding EF-hand family protein
MD07G1265900	33427173	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) fami
MD07G1266000	33429168	XB3 ortholog 3 in Arabidopsis thaliana

Tableau S5 : Expression différentielle de 42 gènes candidats inclus dans l'intervalle du QTL qF11, entre les classes sansQTL et F11F17, 8h, 24h et 72h après infection. Rouge : induction significative, bleu : répression significative.

Séquence	ratio_8hpi_ F11F17/sansQTL	ratio_24hpi_ F11F17/sansQTL	ratio_72hpi_ F11F17/sansQTL	Annotation fonctionnelle
MD11G1009500	-0.02	0.44	-0.45	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
MD11G1008300	0.04	0.25	-0.40	calmodulin-binding family protein
MD11G1004100	-0.19	-0.33	-0.38	Peroxidase superfamily protein
MD11G1028500	-0.44	-0.23	-0.31	Putative glycosyl hydrolase of unknown function (DUF1680)
MD11G1004300	0.01	-0.07	-0.28	Ribosomal protein L1p/L10e family
MD11G1012800	-0.10	0.17	-0.23	chromomethylase 3
MD11G1021800	0.18	-0.03	-0.22	carbamoyl phosphate synthetase A
MD11G1014900	-0.23	-0.03	-0.19	seven in absentia of Arabidopsis 2
MD11G1022000	0.19	0.09	-0.17	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
MD11G1007800	-0.34	0.16	-0.08	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD11G1028900	0.01	0.00	-0.03	MSF1-like family protein
MD11G1013100	0.06	0.17	-0.02	chromomethylase 3
MD11G1028700	0.11	0.24	-0.02	Protein kinase superfamily protein
MD11G1004900	0.50	-0.01	0.01	Mitochondrial substrate carrier family protein
MD11G1004800	0.48	-0.05	0.05	alcohol dehydrogenase 1
MD11G1011200	-0.32	0.14	0.14	long chain base2
MD11G1005800	-0.04	-0.13	0.16	ARM repeat superfamily protein
MD11G1010600	0.33	0.06	0.16	protein phosphatase 2A-3
MD11G1028100	0.17	0.33	0.17	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
MD11G1019300	0.50	0.44	0.23	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
MD11G1029400	0.22	-0.03	0.33	ZIP metal ion transporter family
MD11G1006000	0.18	0.23	0.34	Peptidyl-tRNA hydrolase family protein
MD11G1021400	0.39	0.42	0.42	receptor-like protein kinase 1
MD11G1019900	0.69	1.02	0.79	Glycolipid transfer protein (GLTP) family protein
MD11G1012400	0.69	0.11	0.01	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
MD11G1009700	0.98	-0.37	0.15	Amino acid permease family protein
MD11G1005200	0.57	0.33	0.19	related to AP2 11
MD11G1019500	0.65	0.10	0.20	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD11G1021100	0.57	-0.08	0.34	receptor-like protein kinase 1
MD11G1009400	0.31	0.66	0.37	acyl-activating enzyme 18
MD11G1030400	0.21	0.59	0.57	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1019800	0.28	0.57	0.89	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
MD11G1022700	0.00	0.14	0.60	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) plant phosphoribosyltransferase family protein
MD11G1010000	-0.30	0.29	0.86	Amino acid permease family protein
MD11G1025200	-0.58	-1.29	-0.71	receptor-like protein kinase 1
MD11G1015300	-0.21	-1.16	-0.50	peroxidase 2
MD11G1029500	-0.25	-0.56	-0.18	C2H2-type zinc finger family protein
MD11G1011600	-0.26	-0.57	-0.16	transferases
MD11G1006300	-0.27	-0.20	-0.65	HMG (high mobility group) box protein
MD11G1004700	-0.08	-0.04	-0.51	F1FO-ATPase inhibitor protein
MD11G1011100	0.61	-0.31	-0.51	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
MD11G1023100	-0.88	0.12	0.57	lipoxygenase 2

La puce d'expression AryANE v1.0 (Celton et al., 2014) est la première puce recouvrant l'ensemble des transcrits du pommier. En effet elle est composée de 126 022 sondes (sens et antisens) qui représentent les transcrits prédits à partir de la séquence de référence du

génomique du pommier séquencée en 2010 (Velasco et al., 2010). Des analyses d'expression différentielle ont été réalisées dans l'équipe pour comparer les gènes différentiellement exprimés entre les classes de QTLs sansQTL, F11F17, T1 et T1F11F17 avant, et 8h, 24h et 48h après inoculation avec *Vj*, à l'aide de cette puce. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la thèse de G. Laloï (Laloï, 2016). Les données d'expression différentielles entre les classes sansQTL et F11F17, disponibles pour les gènes de la puce Aryane inclus dans les intervalles de qF11 et qF17, ont été utilisées ici pour mettre en évidence des gènes candidats expressionnels impliqués dans ces QTLs. Malheureusement, cette première version de microarray (améliorée depuis) ne couvrait pas que peu de gènes prédits sur le nouveau génome GDDH13, car les sondes avaient été dessinées sur la base des gènes initialement prédits sur la première version du génome (Golden Delicious, Velasco et al., 2010), de qualité très inférieure à la séquence de GDDH13. Cette analyse est donc très incomplète.

Les données d'expression différentielle par puce Aryane de 42 gènes seulement sont disponibles dans l'intervalle de qF11 (**Tableau S5**). L'expression de 23 des gènes n'est pas différentielle entre la classe sansQTL et la classe F11F17 aux trois temps de la cinétique après l'infection. Au sein des 19 gènes différentiellement exprimés entre la classe sansQTL et la classe F11F17 à un des trois temps de la cinétique, 11 sont surexprimés dans la classe F11F17, 6 sont réprimés et les deux autres sont surexprimés et réprimés en fonction du temps de la cinétique.

Tableau S6 : Expression différentielle de 22 gènes candidats inclus dans l'intervalle du QTL qF17, entre les classes sansQTL et F11F17, 8h, 24h et 72h après infection. Rouge : induction significative, bleu : répression significative.

Séquence	ratio_8hpi_ F11F17/sansQTL	ratio_24hpi_ F11F17/sansQTL	ratio_72hpi_ F11F17/sansQTL	Annotations fonctionnelle
MD17G1102800	0.48	0.19	-0.05	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
MD17G1095500	0.44	-0.22	-0.11	Transmembrane protein 97
MD17G1098300	0.23	-0.32	-0.44	SKU5 similar 5
MD17G1102700	-0.04	0.15	0.16	serine/threonine protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B prime gamma
MD17G1096200	0.16	-0.18	-0.27	glutamate receptor 5
MD17G1089600	-0.33	0.04	0.09	F-box/RNI-like superfamily protein
MD17G1095000	0.19	0.40	0.27	homeodomain GLABROUS 2
MD17G1104000	-0.35	0.05	-0.18	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
MD17G1102300	0.02	-0.04	-0.46	RmlC-like cupins superfamily protein
MD17G1089900	0.05	0.21	-0.26	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
MD17G1103100	0.65	0.24	0.19	glycosyl hydrolase 9B8
MD17G1095600	0.16	0.57	0.44	Transmembrane protein 97
MD17G1099200	0.40	0.37	0.72	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
MD17G1099800	-0.92	-0.15	0.09	cellulose synthase-like B3
MD17G1100800	-0.77	0.28	-0.40	hydroperoxide lyase 1
MD17G1099400	-0.90	-0.75	-0.50	cellulose synthase-like B4
MD17G1092800	-0.52	-0.69	0.44	TraB family protein
MD17G1090100	-0.10	-0.41	-0.77	terpene synthase-like sequence-1
MD17G1089700	0.43	-0.10	-0.52	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
MD17G1105700	-0.46	-0.08	-0.68	RING/U-box superfamily protein
MD17G1096700	-0.13	-0.16	-0.66	aconitase 3
MD17G1091600	-0.64	0.78	0.54	beta-amylase 6

Les données d'expression différentielle de seulement 22 gènes sont disponibles dans l'intervalle de qF17 (**Tableau S6**). L'expression de 10 des gènes n'est pas différentielle entre la classe sansQTL et la classe F11F17 aux trois temps de la cinétique après l'infection. Au sein des 12 gènes différentiellement exprimés entre la classe sansQTL et la classe F11F17 à un des trois temps de la cinétique, 3 sont surexprimés dans la classe F11F17, 8 sont réprimés et la dernière séquence est surexprimée et réprimée en fonction du temps de la cinétique.

3- Chapitre V

Tableau S7 : Résultats du dessin des amorces à chaque étape : choix de la séquence cible d'après les analyses phylogénétiques, validation bio-informatiques et validation par qPCR.

Famille de gène	Abbréviation	Séquences sélectionnés	Séquence cible	Nombre de couple testé	Remarques	Amorces validées	Validation Cce_61	Validation classe QTL
Barwin domain protein	PR-4	1	MD04G1225300	4	+ test amorce qPFD	1 (qPFD)		x
serine protease inhibitor	PR-6	1	MD13G1208400	3		0		
Chitinase A/Glycosyl hydrolase family 18	PR-8	1	MD01G1071700	1		0		
			MD07G1282800	3		1	x	
Thionin	PR-13	1	MD17G1196900	4		0		
Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase	HMGR	1	MD10G1143400	1	+ test amorce qPFD	1 (qPFD)	x	x
Ascorbate Peroxidase	APOX	1	MD00G1029300	3		1	x	
Cinnamoyl-CoA reductase/Epimerase	CAD	1			pas de NPZ suffisante dans la séquence + test amorce qPFD	1 (qPFD)	x	x
Pollen Ole e1/extensin	extensin	1	MD05G1338000 / MD10G1293100	3	séquence consensus	1	x	
Chitinase class I	PR-3,PR-11	2	MD02G1120200 / MD02G1120300 / MD15G1234400	2	séquence consensus	0		
Gamma thionin/defensin	PR-12	2	MD05G1234500	3		0		
Glucan synthase/Callose synthase	GS/CS	2	MD09G1247400	1	+ test amorce qPFD	1 (qPFD)	x	x
Agglutinine	Agg	3	MD07G1171100	5		1	x	x
Polyphenol oxidase	PPO	3	MD10G1299400	5		1	x	
aromatic and neutral amino acid transporter	-	3			aucune amorce possible	0		
Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase/Alliinase/CSL	CSL	4			test amorce qPFD	1 (qPFD)	x	x
Chalcone/stilbene synthase	CHS/STS	5			non testé	0		
Wall-associated kinase	WAK	5			non testé	0		
Cysteine-rich secretory protein	PR-1	6			test amorce qPFD	0		
Terpene Synthase / Fatty acyl-CoA reductase	TPS / FAR	6			pas de NPZ suffisante dans la séquence + test amorce qPFD	1 (qPFD)	x	
Glycosyl hydrolase family 17	PR-2	8			test amorce qPFD	1 (qPFD)	x	
Bet v1, Mal d1 family	PR-10	27	MD16G1171100	5		1	x	x
Cupin/germin/oxalate oxidase	PR-15,PR-16	31			non testé	0		
Pectinesterase	Pect	aucune	MD16G1022000 / MD16G1022100	3		0		
Farnesyl diphosphate synthase / Farnesyl pyrophosphate synthase	FDS / FPP5	aucune			test amorce qPFD	1 (qPFD)	x	
NPR/NIM family	NPR/NIM	aucune			test amorce qPFD	1 (qPFD)		x
Jasmonate O-methyltransferase	JMT	supplémentaire			test amorce qPFD	1 (qPFD)		x
Lipoxygenase AtLOX2	LOX2	supplémentaire			test amorce qPFD	1 (qPFD)		x
Dihydroflavonol reductase	DFR	supplémentaire			test amorce qPFD	1 (qPFD)		x
EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1	EIN3	supplémentaire			test amorce qPFD	1 (qPFD)		x
WRKY transcription factor 30	WRKY	supplémentaire			test amorce qPFD	1 (qPFD)		x

Tableau S8 : Résultats des recherches de SNP dans les amorces de 10 gènes de la qPFD.

Gène	Séquence cible	Annotation	Amorce sens	Amorce antisens	BLAST GDDH13 v1.1	BLAST HFTH1 v1.0	NPZ
HMGR	MD10G1268900	HMGR	AACAGGTCAAGCAGATTC	TTGTCAGAGCAGTAGTTG	pseudogène HMGR	pas de gène	NA
CAD	MD11G1190800	CAD	GGAGCCCAAGACAGACTTCAAC	CGCCTTCACAACCCTCAACAG	gène CAD	gène CAD	1 SNP (fin Amorce antisens)
CSL	MD10G1035800	CSL	CACCCTGTCTGTTCCAATCG	AGCAATCTTTATCTTCTCCCTCTC	gène CSL	pas de gène	1 SNP (début Amorce sens)
PR2	MD14G1080100	PR2	AATTGTTATATCGGAGAGTG	TGGCAAAGATGTAAGTTTC	gène PR2	gène PR2	1 SNP (Amorce sens)
FAR	MD10G1311000	TPS	GATATTTTAGATGAGGCGAAAGC	GCGTTGATTTGCCATTTGAC	gène TPS	gène TPS	1 SNP (début Amorce sens)
FPPS	MD10G1340100	FDS	TCTTGTTGGTGGTCAAAG	CTGCCTCTGTAATCTTGC	gène FDS	gène FDS	1 SNP (fin Amorce antisens)
CaS	MD02G1319100	CaS	TGCCTTCATGCCAACGGGATG	CGGAAACAAACGGAAACCAAGCC	gène CaS	gène CaS	NPZ
TuA	MD03G1004400	TuA	GTTCAATGCTGTTGGTGGTG	CTGCGGAGAAGGATAGATGG	gène TuA	gène TuA	NPZ
Actin	MD14G1142600	Actin	CAACCTCTCGTCTGTGATAATG	GCATCCTTGTCCCATCC	gène Actin	gène Actin	NPZ
GAPDH	MD16G1111100	GAPDH	CTTGTCTCCGCCCTTCC	CGTAGTTCCTCCATTGTTGC	gène PR1 (MD05G1110200)	gène PR1 (MD05G1110200)	1 SNP (Amorce antisens)

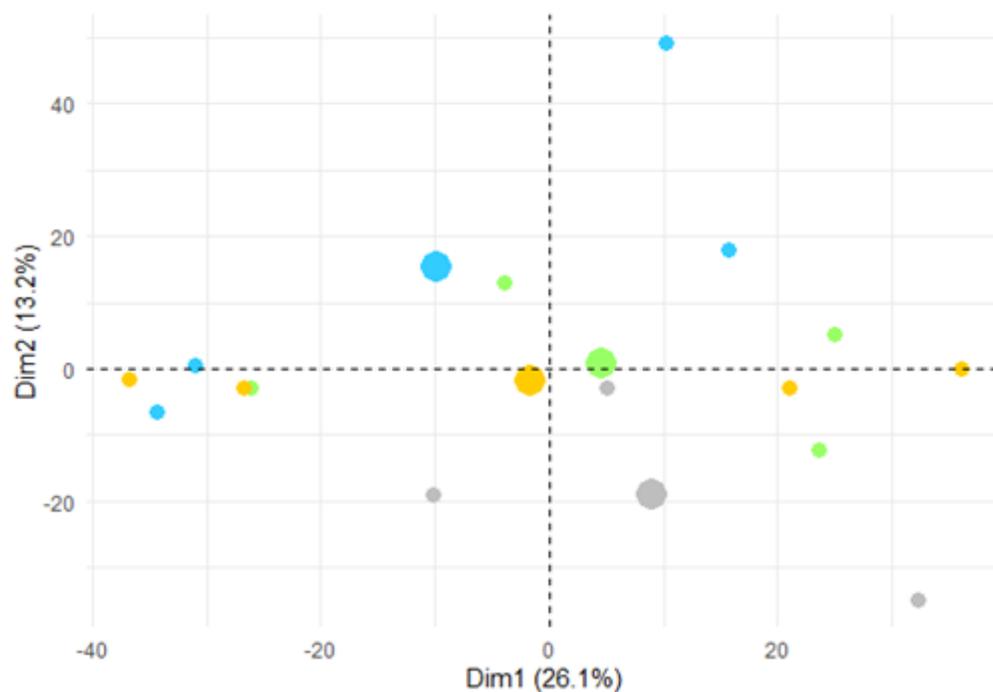


Figure S5 : Analyse en composante principale des signaux métaboliques dans les classes de QTL (sansQTL en gris, F11F17 en vert, T1 en orange et T1F11F17 en bleu) au temps J0 et après traitement à l'eau.

Tableau S9 : Caractéristiques des 8 signaux métaboliques accumulés constitutivement et de manière la plus significative dans la classe sansQTL par rapport aux classes F11F17, T1 et/ou T1F11F17.

Signal	Contraste	Contribution	Voie
M474T33	F11F17/sansQTL	-0.22	Acides gras
M625T30	F11F17/sansQTL	-0.28	Chlorins
M599T27_1	T1/sansQTL	0.22	Flavonoides
M584T27	T1/sansQTL	0.22	Flavonoides
M583T27	T1/sansQTL	0.20	Flavonoides
M121T19	T1F11F17/sansQTL	0.32	Flavonoides
M288T14	T1F11F17/sansQTL	0.28	Flavonoides
M107T19_6	T1F11F17/sansQTL	0.20	Flavonoides

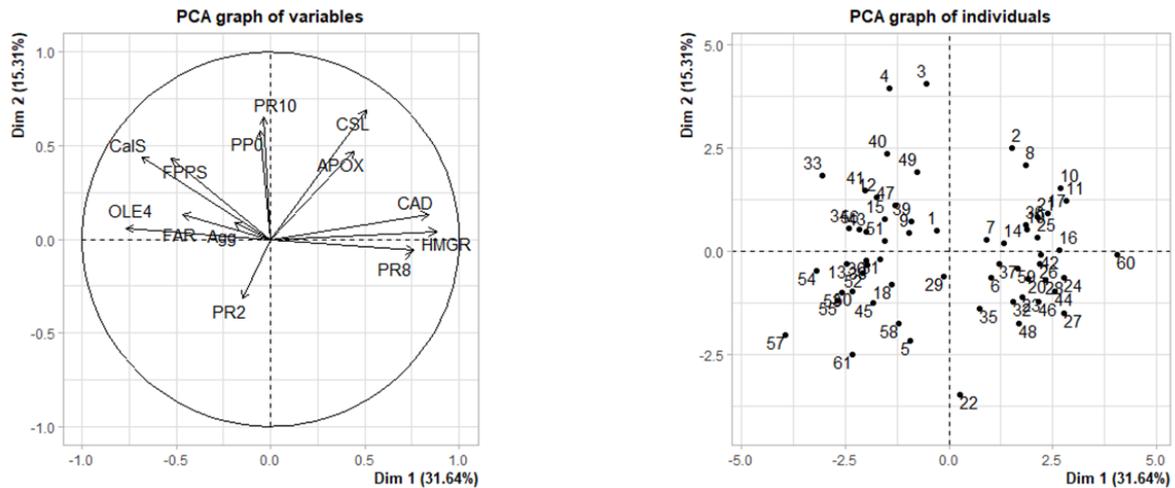


Figure S6 : Résultats de l'ACP réalisée sur l'expression constitutive des 13 gènes de défenses étudiés dans la CCe_61.

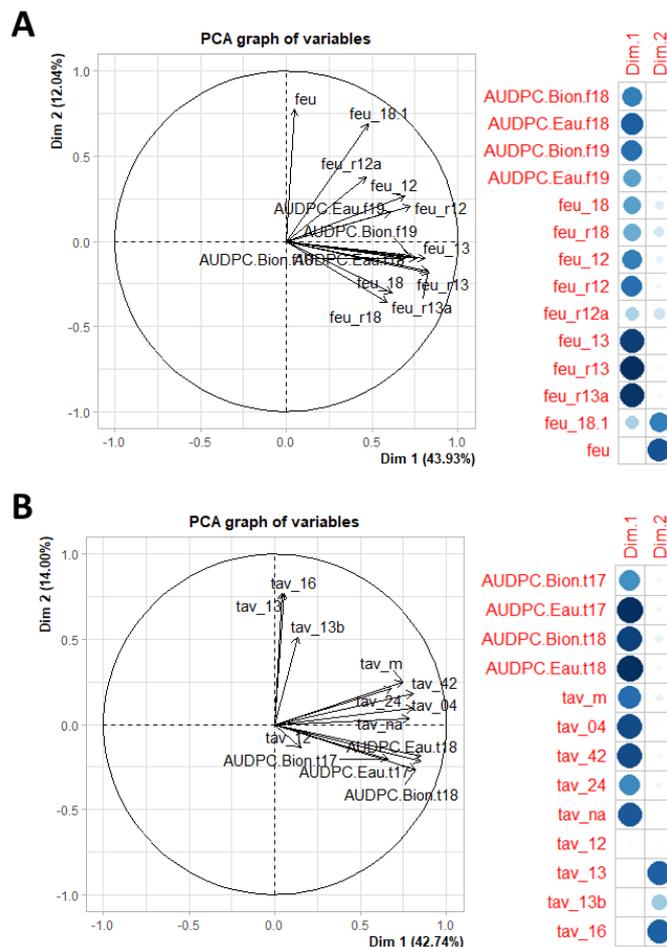
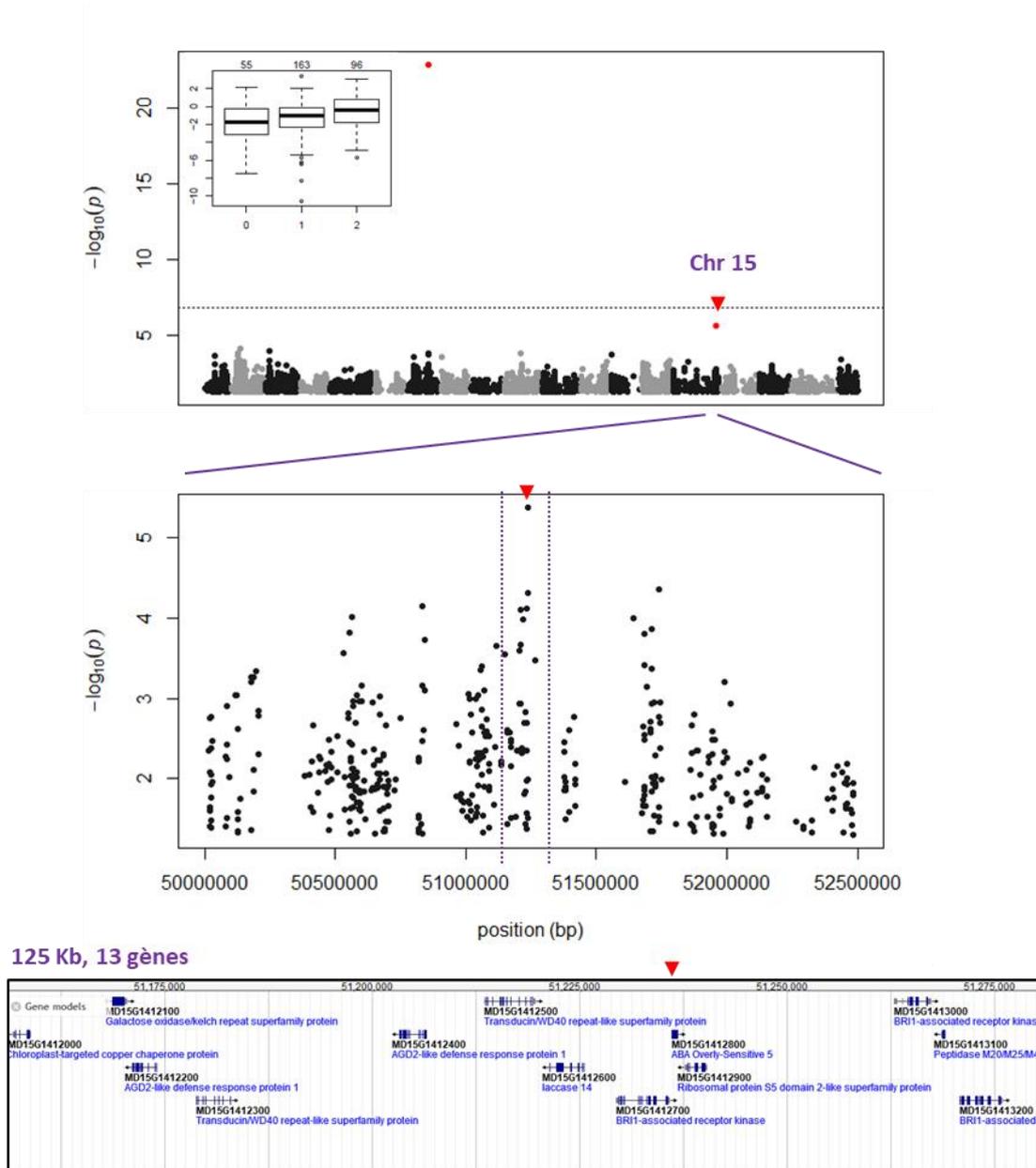


Figure S7 : Résultats des ACP et des corrélations de Pearson (heatmap) réalisées sur les données de sensibilité à la tavelure (A) et au feu bactérien (B) entre tous les tests phénotypiques disponibles pour les 32 variétés de la CCe_32. Les tests les plus corrélés sont indiqués en plus foncé.

Tableau S10 : Coefficients de corrélation de Pearson entre l'expression constitutive relative des 13 gènes de défense étudiés et la sensibilité à *Vi* et à *Ea* pour l'ensemble des tests phénotypiques disponibles (CCe_61) ou l'efficacité de protection de l'ASM (CCe_32). Les seuils de significativité des coefficients de corrélation (à 5%) sont respectivement 0.35 pour CCe_32 et 0.25 pour CCe_61.

			PR2	FAR	APOX	FPPS	HMGR	CSL	OLE4	PR10	PP0	Agg	PR8	CAD	CaIS	
CCe_32	Vi-B04 ₃₂ _1	AUDPC	0.02	0.09	-0.04	-0.21	-0.32	-0.34	0.44	0.01	-0.14	0.36	-0.24	-0.25	0.25	
		Efficacité ASM	-0.08	0.11	-0.07	-0.04	0.18	0.15	-0.19	-0.17	0.07	-0.28	0.30	0.23	0.01	
	Vi-B04 ₃₂ _2	AUDPC	-0.08	0.04	-0.04	-0.13	-0.37	-0.29	0.37	0.04	0.02	0.37	-0.21	-0.19	0.24	
		Efficacité ASM	0.13	0.09	0.13	0.16	0.13	0.21	-0.25	-0.01	0.00	-0.35	0.13	0.23	0.12	
	Ea-1430 ₃₂ _1	AUDPC	-0.01	0.01	0.14	0.18	-0.07	-0.13	0.23	-0.32	0.14	-0.04	-0.18	0.14	0.20	
		Efficacité ASM	0.26	-0.05	-0.47	-0.02	-0.08	0.11	-0.15	-0.15	0.12	-0.14	0.31	0.02	-0.07	
	Ea-1430 ₃₂ _2	AUDPC	0.22	-0.21	-0.08	0.43	0.01	-0.03	-0.06	-0.36	0.14	-0.03	-0.06	0.17	-0.03	
		Efficacité ASM	-0.08	0.10	0.01	-0.18	-0.03	0.23	-0.11	0.15	-0.12	-0.12	0.16	-0.14	-0.04	
	CCe_61	Vi-B04_CCe_2016	sensibilité	-	0.04	-0.03	0.08	-0.09	-0.18	0.26	-0.04	-0.10	0.37	-0.01	-0.07	0.14
		Vi-mix_CCe_2017	sensibilité	-	0.06	0.17	0.06	-0.01	-0.12	0.17	0.02	-0.14	0.15	-0.04	0.03	0.18
Vi-D42_CCe_2017		sensibilité	-	0.14	-0.03	0.07	-0.03	-0.20	0.25	-0.08	-0.16	0.26	0.14	-0.03	0.13	
Vi-NL24_CCe_2018		sensibilité	-	0.21	0.08	0.10	-0.17	-0.16	0.33	0.05	0.04	0.19	-0.14	-0.06	0.37	
Vi-B04_CCe_2012		sensibilité	-	0.02	-0.05	-0.04	-0.09	-0.07	0.14	-0.16	0.05	-0.10	-0.15	-0.11	0.12	
Vi-B04_CCe_2016		sensibilité	-	-0.25	0.11	-0.08	0.20	-0.01	-0.19	-0.24	-0.17	0.01	0.06	0.20	-0.26	
Ea-1430_CCe_2018		sensibilité	-	-0.23	-0.01	0.00	-0.03	-0.07	0.02	-0.16	0.10	0.17	-0.06	0.08	-0.04	
Ea-1430_CCe_2018		sensibilité	-	-0.09	-0.08	0.10	-0.10	-0.33	0.09	-0.27	-0.08	0.14	-0.13	0.03	-0.05	
Ea-1430_CCe_2012		sensibilité	-	-0.13	-0.19	-0.18	-0.01	-0.06	-0.12	-0.41	0.04	0.04	-0.02	0.01	-0.08	

Figure S8 : Résultats de détection par GWAS (Manhattan plot) d'un QTL d'expression du gène Agg et localisation physique du SNP significatif.



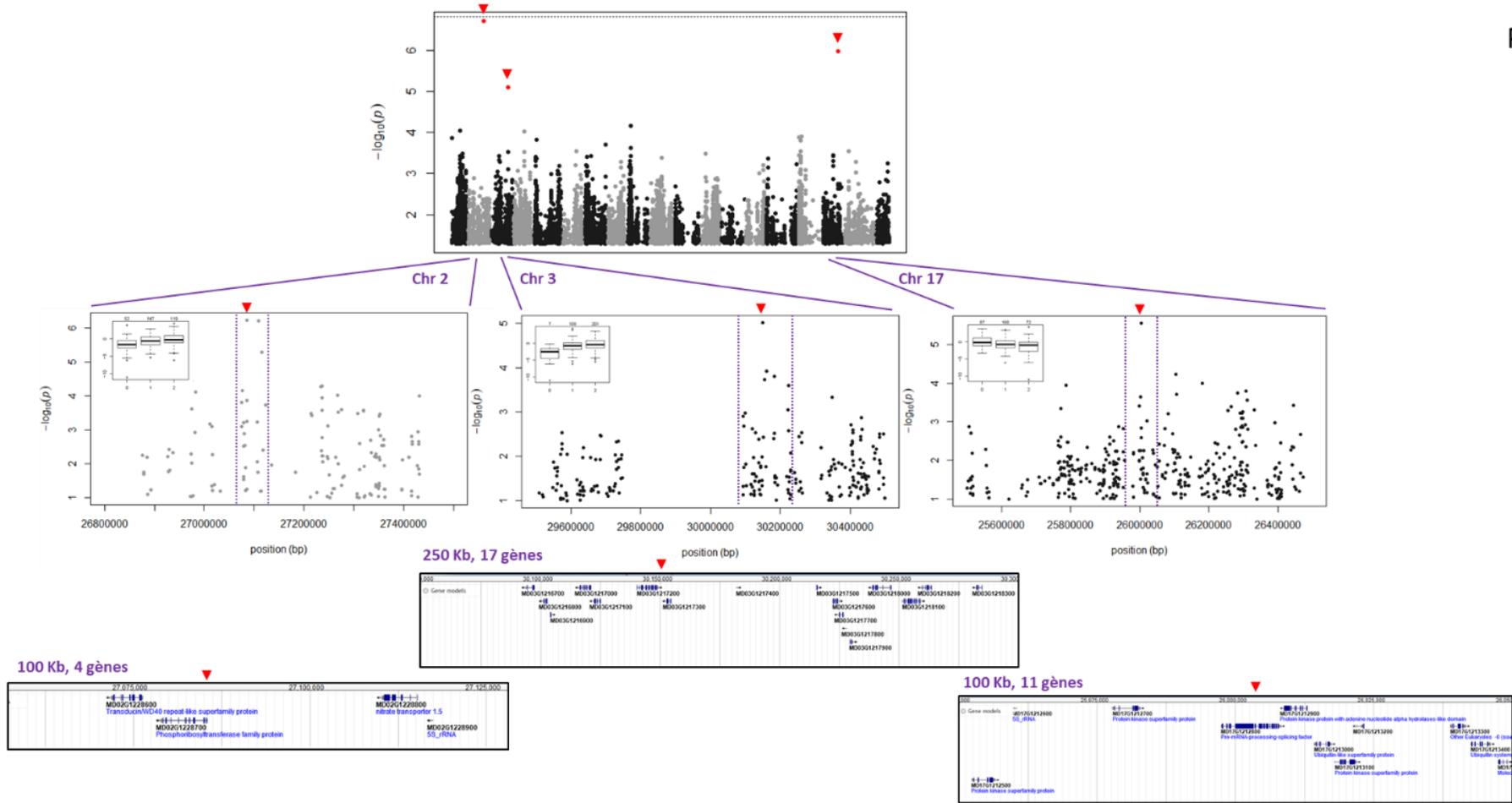


Figure S9 : Résultats de détection par GWAS (Manhattan plot) de trois QTLs d'expression (sous le seuil de significativité) du gène PPO et localisation physique du SNP.

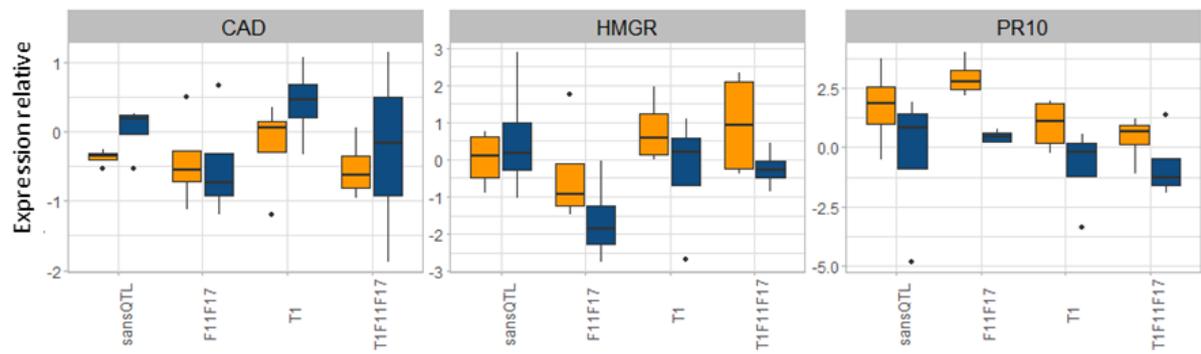


Figure S10 : Expressions relatives des 3 gènes de défense induits significativement par l'ASM en fonction des classes de QTLs. Les traitements sont représentés en bleu pour l'eau et orange pour l'ASM.

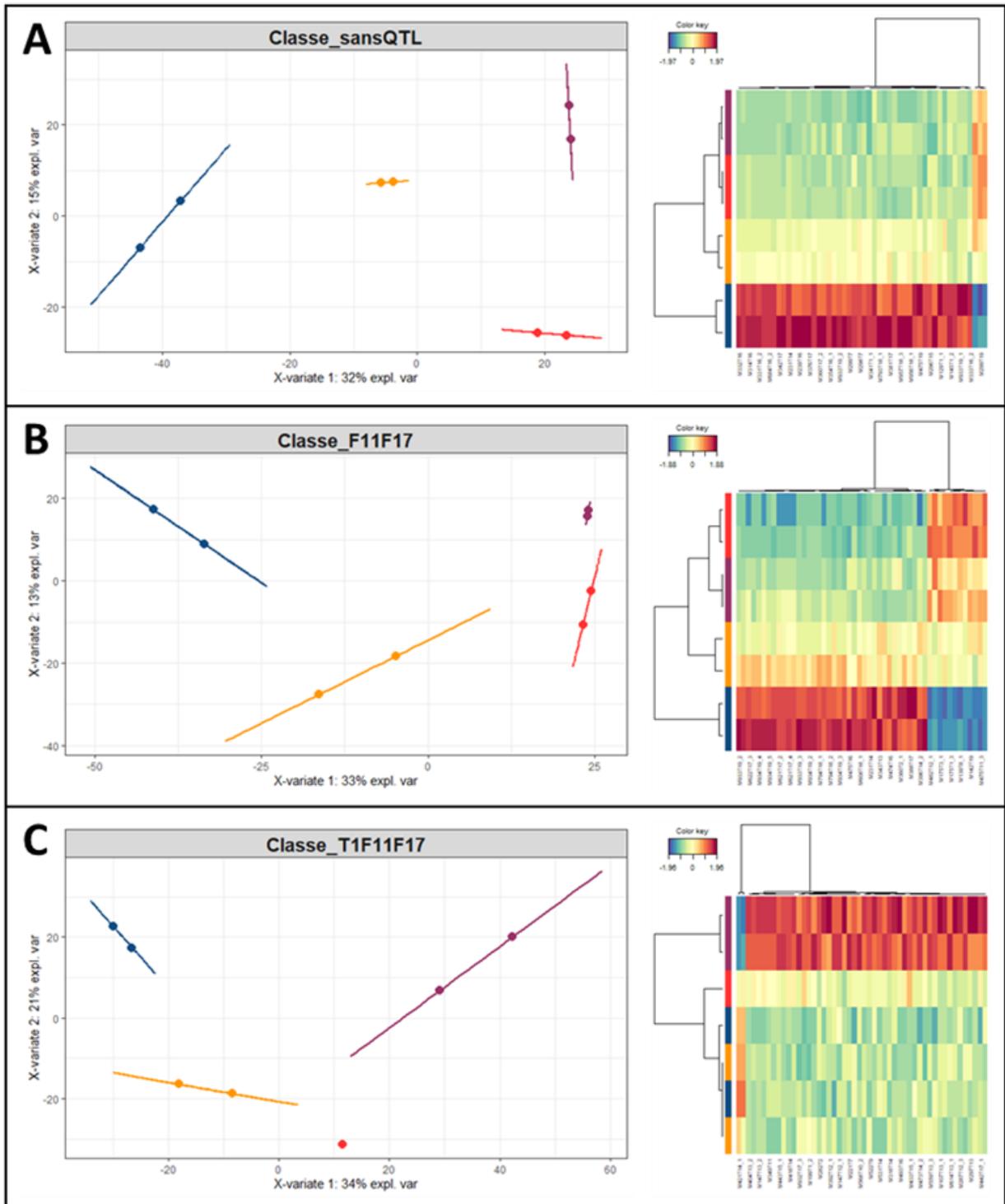


Figure S11 : Résultats des régressions PLS sur les intensités des métabolites, des échantillons prélevés 2018, induits par les traitements eau (en bleu), ASM (en orange), LBG (en rouge) et Kendal (en violet) et heatmaps dans les classes sansQTL (A), F11F17 (B) et T1F11F17 (C).

Tableau S10 : Caractéristiques des signaux métaboliques accumulés après un traitement (ASM ou Php) par rapport à la condition témoin dans les classes sansQTL, F11F17, T1 et T1F11F17. Les signaux communs entre les deux traitements SDP sont représentés en rouge.

Signal	Contraste	Classe	Contribution
M405T14	ASM/Eau	sansQTL	-0.28
M298T7	ASM/Eau	sansQTL	-0.28
M329T8	ASM/Eau	sansQTL	0.25
M479T12_1	ASM/Eau	sansQTL	-0.24
M349T16_2	ASM/Eau	sansQTL	-0.24
M231T14	ASM/Eau	sansQTL	-0.23
M862T16	ASM/Eau	sansQTL	-0.23
M145T1_2	ASM/Eau	sansQTL	-0.22
M365T1_4	ASM/Eau	sansQTL	-0.22
M115T1_1	ASM/Eau	sansQTL	-0.22
M543T1_2	ASM/Eau	sansQTL	-0.19
M341T1_1	ASM/Eau	sansQTL	0.18
M132T1_2	ASM/Eau	sansQTL	-0.18
M348T16	ASM/Eau	sansQTL	0.18
M282T1_2	ASM/Eau	sansQTL	0.16
M327T15_1	ASM/Eau	sansQTL	0.16
M296T15	ASM/Eau	sansQTL	0.15
M265T1_2	ASM/Eau	sansQTL	0.15
M475T19	ASM/Eau	F11F17	-0.22
M345T19	ASM/Eau	F11F17	-0.22
M322T20	ASM/Eau	F11F17	0.22
M577T17_1	ASM/Eau	F11F17	0.21
M577T17_2	ASM/Eau	F11F17	0.21
M562T15_4	ASM/Eau	F11F17	0.21
M562T15_1	ASM/Eau	F11F17	0.21
M187T19	ASM/Eau	F11F17	0.20
M164T20	ASM/Eau	F11F17	0.20
M564T16_5	ASM/Eau	F11F17	0.20
M360T2_2	ASM/Eau	F11F17	-0.19
M322T19	ASM/Eau	F11F17	0.19
M431T12	ASM/Eau	F11F17	0.19
M231T14	ASM/Eau	F11F17	-0.19
M275T1_3	ASM/Eau	F11F17	0.18
M289T13_1	ASM/Eau	F11F17	0.18
M239T15	ASM/Eau	F11F17	0.18
M475T11_3	ASM/Eau	F11F17	0.17
M120T4_2	ASM/Eau	F11F17	0.16
M491T11	ASM/Eau	F11F17	0.16
M175T1_3	ASM/Eau	F11F17	0.15
M600T11_2	ASM/Eau	F11F17	-0.15
M394T17	ASM/Eau	F11F17	0.15
M780T10_3	ASM/Eau	T1F11F17	-0.25
M923T11_5	ASM/Eau	T1F11F17	-0.25
M382T1_1	ASM/Eau	T1F11F17	0.24
M886T14_2	ASM/Eau	T1F11F17	0.23
M874T11_1	ASM/Eau	T1F11F17	-0.23
M316T15_3	ASM/Eau	T1F11F17	0.22
M235T15	ASM/Eau	T1F11F17	0.22
M580T10_2	ASM/Eau	T1F11F17	0.21
M566T11_3	ASM/Eau	T1F11F17	-0.20
M885T14_2	ASM/Eau	T1F11F17	0.20
M298T9	ASM/Eau	T1F11F17	-0.20

M799T17_2	ASM/Eau	T1F11F17	-0.19
M641T2	ASM/Eau	T1F11F17	0.18
M484T16	ASM/Eau	T1F11F17	-0.18
M636T10_1	ASM/Eau	T1F11F17	0.18
M265T1_1	ASM/Eau	T1F11F17	0.17
M616T16	ASM/Eau	T1F11F17	-0.17
M723T14_3	ASM/Eau	T1F11F17	0.15
M142T0	PhP/Eau	sansQTL	0.30
M684T16_2	PhP/Eau	sansQTL	0.29
M684T16_1	PhP/Eau	sansQTL	0.28
M231T14	PhP/Eau	sansQTL	0.27
M349T16_2	PhP/Eau	sansQTL	0.26
M684T16_3	PhP/Eau	sansQTL	0.24
M237T14	PhP/Eau	sansQTL	0.22
M175T1_3	PhP/Eau	sansQTL	0.21
M666T4	PhP/Eau	sansQTL	0.20
M799T17_4	PhP/Eau	sansQTL	0.19
M341T1_1	PhP/Eau	sansQTL	0.19
M479T12_1	PhP/Eau	sansQTL	-0.18
M298T7	PhP/Eau	sansQTL	0.18
M862T16	PhP/Eau	sansQTL	0.17
M788T13_3	PhP/Eau	sansQTL	-0.16
M348T16	PhP/Eau	sansQTL	0.15
M723T14_3	PhP/Eau	sansQTL	0.15
M475T19	PhP/Eau	F11F17	-0.24
M345T19	PhP/Eau	F11F17	-0.23
M956T18_2	PhP/Eau	F11F17	-0.23
M956T18_3	PhP/Eau	F11F17	-0.23
M955T18_4	PhP/Eau	F11F17	-0.23
M245T2	PhP/Eau	F11F17	0.21
M955T18_3	PhP/Eau	F11F17	-0.21
M382T17	PhP/Eau	F11F17	-0.21
M956T18_4	PhP/Eau	F11F17	-0.21
M164T20	PhP/Eau	F11F17	0.20
M956T18_1	PhP/Eau	F11F17	-0.20
M381T17	PhP/Eau	F11F17	-0.19
M795T19	PhP/Eau	F11F17	-0.19
M955T18_5	PhP/Eau	F11F17	-0.19
M273T13_1	PhP/Eau	F11F17	0.19
M469T2	PhP/Eau	F11F17	0.17
M956T18_5	PhP/Eau	F11F17	-0.17
M333T15_1	PhP/Eau	F11F17	-0.17
M475T11_3	PhP/Eau	F11F17	0.16
M1002T17_6	PhP/Eau	F11F17	-0.15
M536T11	PhP/Eau	F11F17	0.15
M304T9	PhP/Eau	T1F11F17	0.20
M451T15	PhP/Eau	T1F11F17	-0.20
M923T11_5	PhP/Eau	T1F11F17	-0.20
M772T16_2	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M641T2	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M382T1_1	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M933T19_2	PhP/Eau	T1F11F17	-0.19
M163T12	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M595T10_4	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M232T2	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M1003T14_2	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M245T2	PhP/Eau	T1F11F17	0.19
M580T10_2	PhP/Eau	T1F11F17	0.19

M421T12	PhP/Eau	T1F11F17	-0.18
M718T16_2	PhP/Eau	T1F11F17	0.18
M594T10_3	PhP/Eau	T1F11F17	0.18
M104T1_2	PhP/Eau	T1F11F17	0.17
M500T6_2	PhP/Eau	T1F11F17	0.16
M433T15_1	PhP/Eau	T1F11F17	0.15
M433T15_3	PhP/Eau	T1F11F17	0.15
M216T1_2	PhP/Eau	T1F11F17	-0.15

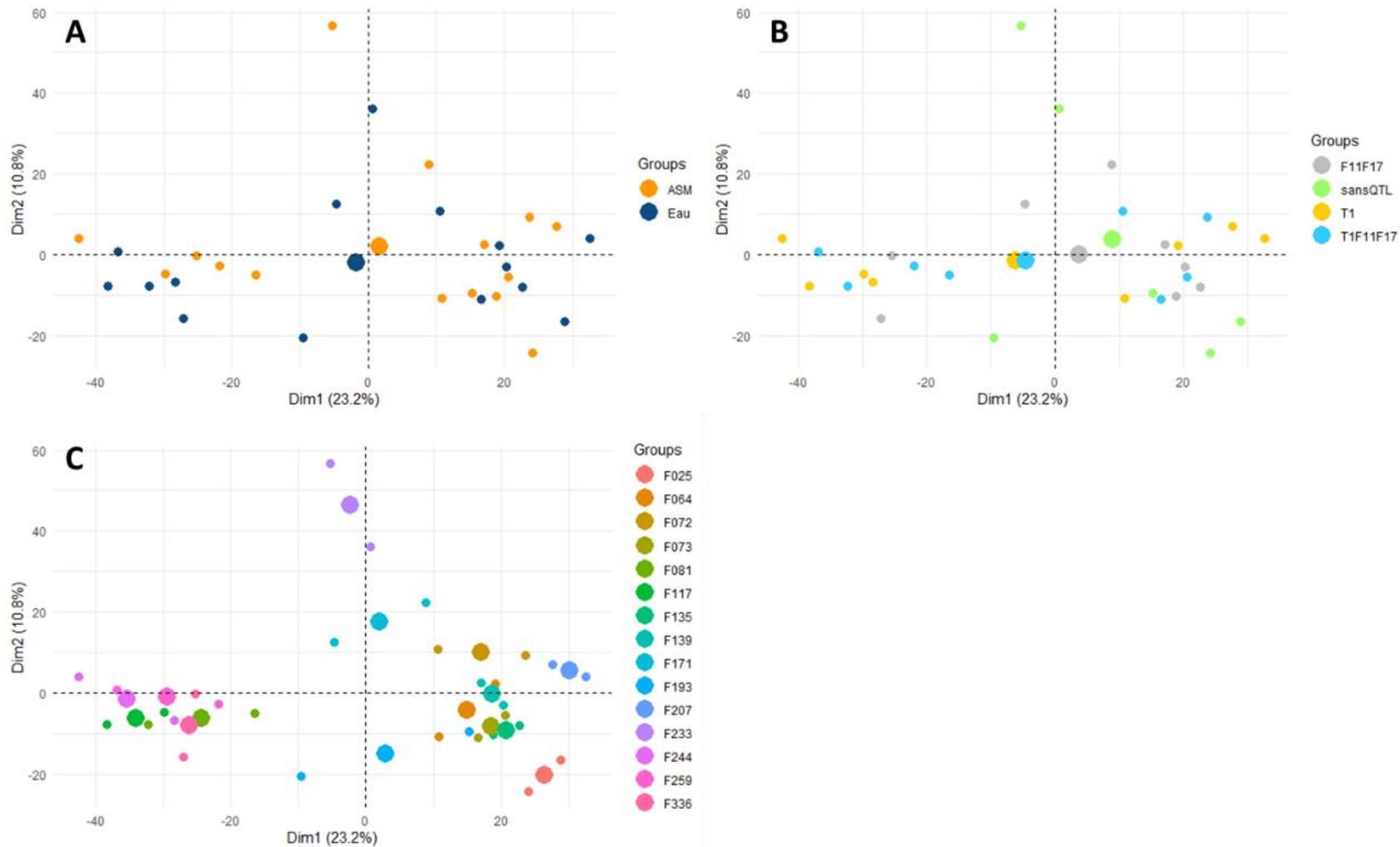


Figure S12 : ACP réalisée sur les échantillons à J0 dans les classes de QTL pour étudier l'effet de l'ASM sur le métabolome. Des filtres de couleurs sont appliqués pour évaluer les facteurs qui influencent la structuration de l'ACP avec : A – la variable de traitement (Eau en bleu, ASM en orange), B- les classes de QTLs (sansQTL en vert, F11F17 en gris, T1 en orange et T1F11F17 en bleu) et C- les génotypes.

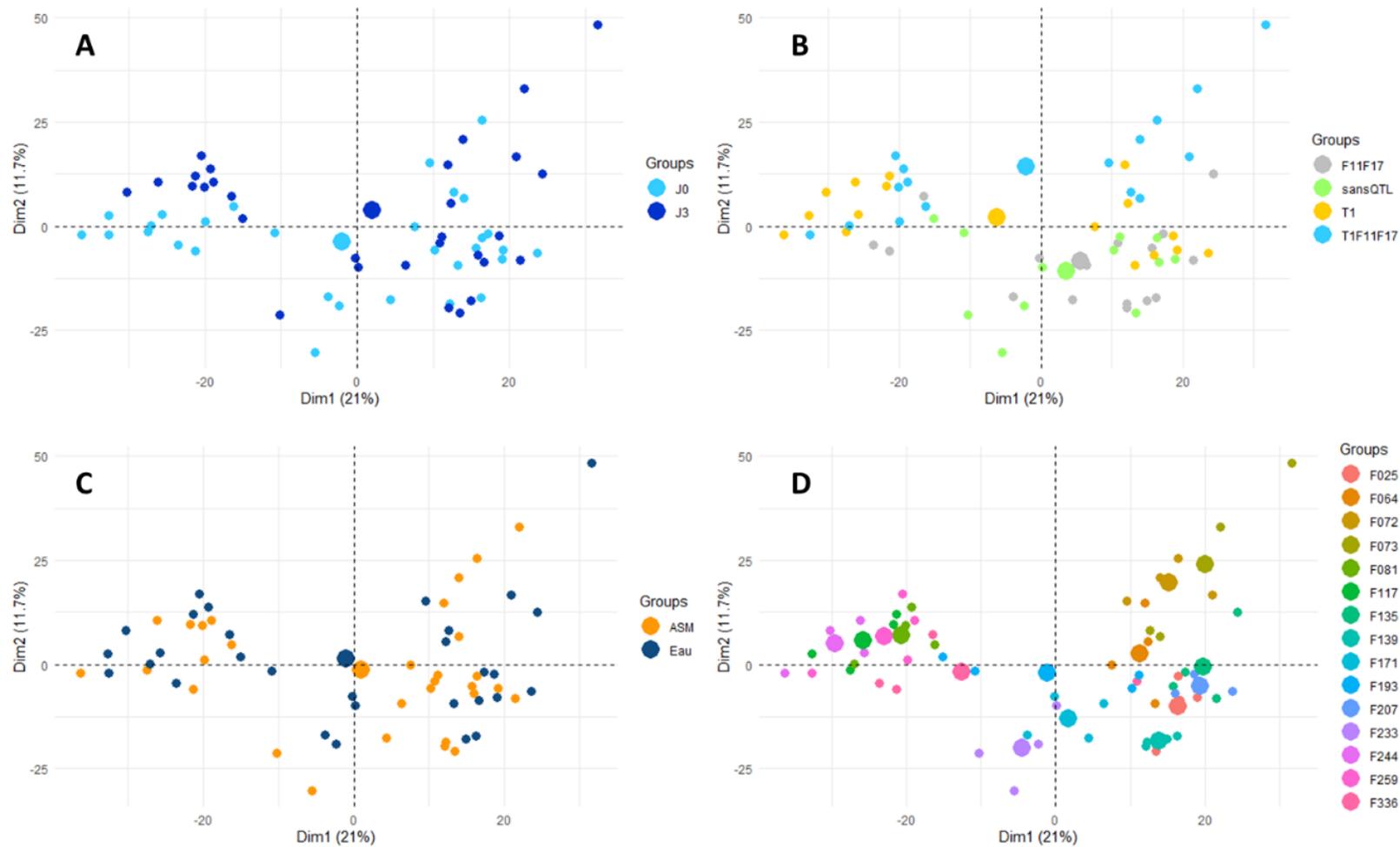


Figure S13 : ACP réalisée sur les échantillons à J0 dans les classes de QTL pour étudier l'effet de l'ASM sur le métabolome. Des filtres de couleurs sont appliqués pour évaluer les facteurs qui influencent la structuration de l'ACP avec : A- la variable d'infection (J0 en bleu clair, J3 en bleu foncé), B- les classes de QTLs (sansQTL en vert, F11F17 en gris, T1 en orange et T1F11F17 en bleu) C- la variable de traitement (Eau en bleu, ASM en orange) et D- les génotypes.

Tableau S11 : Intensité des signaux métaboliques correspondant à l'ASM et les composés de dégradation de l'ASM dans les différentes classes de QTLs et dans la condition témoin et après un traitement à l'ASM. L'intensité des signaux est représentée par un dégradé du bleu au rouge.

Classe	Traitement	M211T22	M212T22	M213T22
F11F17	Eau	173683.754	34845.7661	1006918.55
F11F17	ASM	21996784	1606798.36	1982317.6
sansQTL	Eau	134363.355	47707.8317	25638.7254
sansQTL	ASM	20467651.9	1493270.8	1584594
T1	Eau	103876.431	30392.409	22351.5292
T1	ASM	11713822.6	869226.759	1024745.39
T1F11F17	Eau	112678.724	26125.1778	24373.2789
T1F11F17	ASM	21263375.5	1544620.76	1563864.32

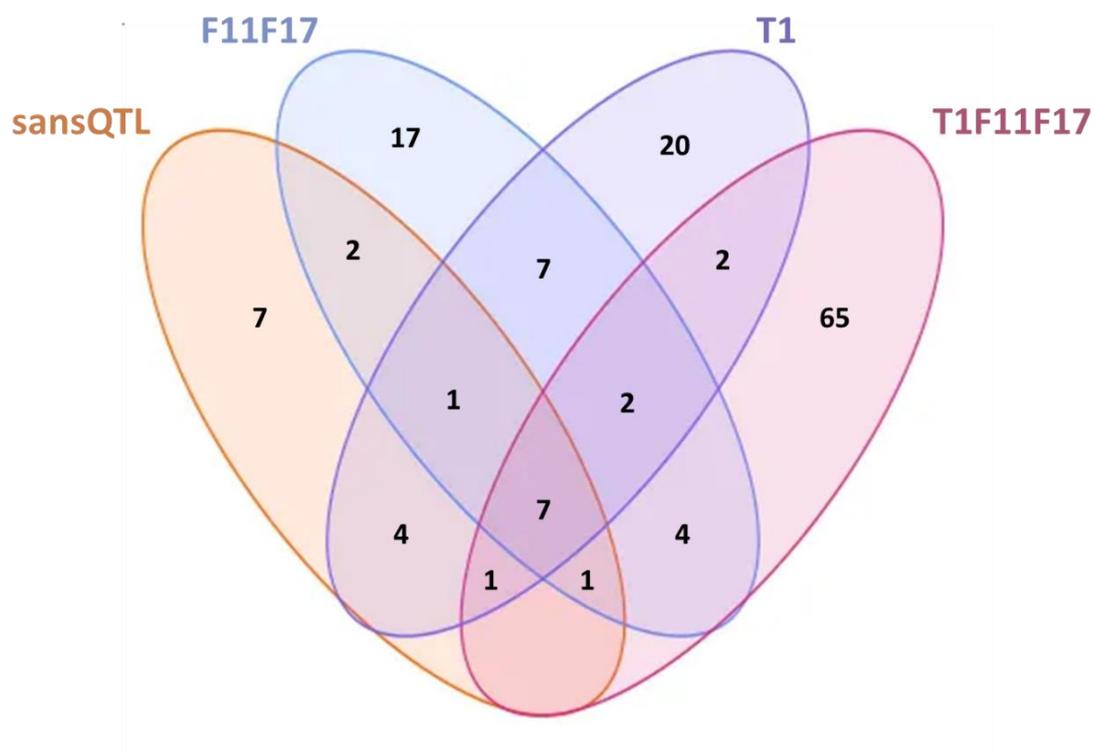


Figure S14 : Diagramme de Venn du nombre de métabolites communs et spécifiques, accumulés dans les classes de QTLs après une infection.

Références bibliographiques

- Abo-Elyour, A.M.K.; Sallam, M.A.A.; Hassan, M.H.A. and Zeller, W. 2010. Effect of Acibenzolar-S-methyl and *Rhynchospora aquatilis* (Ra39) on Chitinase and β -1,3-glucanase Activities and Disease Resistance of Apple Plants. *Plant Pathol. J.* 26: 63–69, [https://doi.org/26\(1\): 63-69](https://doi.org/26(1): 63-69) (2010).
- Abu-Elteen, K.H. and Hamad, M. 2017. Antifungal agents for use in human therapy. In *Fungi*, pp. 299–332. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., <https://doi.org/10.1002/9781119374312.ch12>.
- Ácimović, S.G.; Zeng, Q.; McGhee, G.C.; Sundin, G.W. and Wise, J.C. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–10, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00016>.
- Amarante-Mendes, G.P.; Adjemian, S.; Branco, L.M.; Zanetti, L.C.; Weinlich, R. and Bortoluci, K.R. 2018. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Frontiers in Immunology* 9, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>.
- Andersen, E.J.; Ali, S.; Byamukama, E. and Yen, Y. 2018. Disease resistance mechanisms in plants. *Genes* 9:339, <https://doi.org/10.3390/genes9070339>.
- Arcade, A.; Labourdette, A.; Falque, M.; Mangin, B.; Chardon, F.; Charcosset, A. and Joets, J. 2004. BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20: 2324–2326, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth230>.
- Assis, F.A.; Moraes, J.C.; Assis, G.A. and Parolin, F.J.T. 2015. Induction of caterpillar resistance in sunflower using silicon and Acibenzolar-S-Methyl. *J. Agr. Sci. Tech.* 17: 543–550.
- Badenes, M.L. and Byrne, D.H. 2012. Fruit Breeding. In Badenes, M.L. and Byrne, D.H. (Eds), *Fruit Breeding*, pp. 1–875. Boston, MA: Springer US, <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9>.
- Bai, R.; Ma, F.; Liang, D. and Zhao, X. 2009. Phthalic acid induces oxidative stress and alters the activity of some antioxidant enzymes in roots of *Malus prunifolia*. *Journal of Chemical Ecology* 35: 488–494, <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9615-7>.
- Baldo, A.; Norelli, J.L.; Farrell, R.E.; Bassett, C.L.; Aldwinckle, H.S. and Malnoy, M. 2010. Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus × domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 10(1), <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-1>.
- Barny, M.A.; Guinebretière, M.H.; Marçais, B.; Coissac, E.; Paulin, J.P. and Laurent, J. 1990. Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Molecular Microbiology* 4(5), <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00648.x>.
- Beckerman, J.; Chatfield, J. and Draper, E. 2009. A 33-year evaluation of resistance and pathogenicity in the apple scab–crabapples pathosystem. *HortScience* 44: 599–608, <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.3.599>.
- Bektas, Y. and Eulgem, T. 2015. Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–9, <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00804>.
- Belfanti, E.; Silfverberg-Dilworth, E.; Tartarini, S.; Patocchi, A.; Barbieri, M.; Zhu, J.; Vinatzer, B.A.; Gianfranceschi, L.; Gessler, C. and Sansavini, S. 2004. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 886–890, <https://doi.org/10.1073/pnas.0304808101>.
- Bengtsson, M., Lindhard Pedersen, H., & Grauslund, J. (1999) Occurrence of races of *Venturia inaequalis* in an apple scab race screening orchard in Denmark. Poster session presented at Workshop on Integrated Pome Fruit Diseases.

- Bengtsson, M.; Jaastad, G.; Knudsen, G.; Kobro, S.; Backman, A.-C.; Pettersson, E. and Witzgall, P. 2006. Plant volatiles mediate attraction to host and non-host plant in apple fruit moth, *Argyresthia conjugella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 118: 77–85, <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00359.x>.
- Bengtsson, M.; Lyngs Jørgensen, H.J.; Pham, A.; Wulff, E. and Hockenhull, J. 2006. Screening of organically based fungicides for apple scab (*Venturia inaequalis*) control and a histopathological study of the mode of action of a resistance inducer. *Pome Fruit Diseases IOBC/wprs Bull* 29: 123–127.
- Bengtsson, M.; Wulff, E.; Lyngs Jørgensen, H.J.; Pham, A.; Lübeck, M. and Hockenhull, J. 2009. Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. *European Journal of Plant Pathology* 124: 187–198, <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9405-z>.
- Bianco, L.; Cestaro, A.; Linsmith, G.; Muranty, H.; Denancé, C.; Théron, A.; Poncet, C.; Micheletti, D.; Kerschbamer, E.; Di Pierro, E.A.; Langer, S.; Pindo, M.; Van De Weg, E.; Davassi, A.; Laurens, F.; Velasco, R.; Durel, C.E. and Troggio, M. 2016. Development and validation of the Axiom®Apple480K SNP genotyping array. *Plant Journal* 86: 62–74, <https://doi.org/10.1111/tpj.13145>.
- Bianco, L.; Cestaro, A.; Sargent, D.J.; Banchi, E.; Derdak, S.; Di Guardo, M.; Salvi, S.; Jansen, J.; Viola, R.; Gut, I.; Laurens, F.; Chagné, D.; Velasco, R.; van de Weg, E. and Troggio, M. 2014. Development and validation of a 20K single nucleotide polymorphism (SNP) whole genome genotyping array for apple (*Malus × domestica* Borkh). *PLoS ONE* 9: e110377, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110377>.
- Biharee, A.; Sharma, A.; Kumar, A. and Jaitak, V. 2020. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia* 146: 104720, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104720>.
- Bonasera, J.M.; Kim, J.F. and Beer, S. V. 2006. PR genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biology* 6(1), <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-23>.
- Boudichevskaia, A.; Flachowsky, H. and Dunemann, F. 2009. Identification and molecular analysis of candidate genes homologous to *HcrVf* genes for scab resistance in apple. *Plant Breeding* 128: 84–91, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01537.x>.
- Bowen, J.K.; Mesarich, C.H.; Bus, V.G.M.; Beresford, R.M.; Plummer, K.M. and Templeton, M.D. 2011. *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology* 12: 105–122, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00656.x>.
- Brisset, M.-N.; Cesbron, S.; Thomson, S. V. and Paulin, J. 2000. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106: 529–536, [https://doi.org/106:529–536, 2000](https://doi.org/106:529-536,2000).
- Brisset, M.N. and Dugé de Bernonville, T. 2011. Device for determining or studying the state of stimulation of the natural defenses of plants or portions of plants. Patent WO/2011/161388.
- Broggini, G.A.L.; Galli, P.; Parravicini, G.; Gianfranceschi, L.; Gessler, C. and Patocchi, A. 2009. *HcrVf* paralogs are present on linkage groups 1 and 6 of *Malus*. *Genome* 52: 129–138, <https://doi.org/10.1139/G08-115>.
- Broggini, G.A.L.; Schlathölter, I.; Russo, G.; Copetti, D.; Yates, S.A.; Studer, B. and Patocchi, A. 2020. Chromosome-scale de novo diploid assembly of the apple cultivar ‘Gala Galaxy.’ *BioRxiv* 2020.04.25.058891, <https://doi.org/10.1101/2020.04.25.058891>.
- Broggini, G.A.L.; Wöhner, T.; Fahrenttrapp, J.; Kost, T.D.; Flachowsky, H.; Peil, A.; Hanke, M.-V.; Richter, K.; Patocchi, A. and Gessler, C. 2014. Engineering fire blight resistance into the apple cultivar ‘Gala’ using the FB_MR5 CC-NBS-LRR resistance gene of *Malus × robusta* 5. *Plant Biotechnology Journal* 12, <https://doi.org/10.1111/pbi.12177>.
- Broman, K.W.; Wu, H.; Sen, Ś. and Churchill, G.A. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889–890, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112>.

Brun, H.; Chèvre, A.-M.; Fitt, B.D.L.; Powers, S.; Besnard, A.; Ermel, M.; Huteau, V.; Marquer, B.; Eber, F.; Renard, M. and Andrivon, D. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* (2009): 285–299.

Burketova, L.; Trda, L.; Ott, P.G. and Valentova, O. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances* 33: 994–1004, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.004>.

Bus, V.G.M.; Bassett, H.C.M.; Bowatte, D.; Chagné, D.; Ranatunga, C.A.; Ulluwishewa, D.; Wiedow, C. and Gardiner, S.E. 2010. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated Mildew Immune Selection. *Tree Genetics and Genomes* 6: 477–487, <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0265-2>.

Bus, V.G.M.; Rikkerink, E.H.A.; Caffier, V.; Durel, C.-E. and Plummer, K.M. 2011. Revision of the Nomenclature of the Differential Host-Pathogen Interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annual Review of Phytopathology* 49: 391–413, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095339>.

Bus, V.G.M.; van de Weg, W.E.; Peil, A.; Dunemann, F.; Zini, E.; Laurens, F.N.D.; Blažek, J.; Hanke, V. and Forsline, P.L. 2012. The role of Schmidt “Antonovka” in apple scab resistance breeding. *Tree Genetics and Genomes* 8: 627–642, <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0470-2>.

Caarls, L.; Pieterse, C.M.J. and Van Wees, S.C.M. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–11, <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00170>.

Caffier, V.; Le Cam, B.; Al Rifai, M.; Bellanger, M.-N.; Comby, M.; Denancé, C.; Didelot, F.; Expert, P.; Kerdraon, T.; Lemarquand, A.; Ravon, E. and Durel, C.-E. 2016. Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific Quantitative Trait Locus. *Infection, Genetics and Evolution* 44: 541–548, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.016>.

Caffier, V.; Didelot, F.; Pumo, B.; Causeur, D.; Durel, C.E. and Parisi, L. 2010. Aggressiveness of eight *Venturia inaequalis* isolates virulent or avirulent to the major resistance gene *Rvi6* on a non-*Rvi6* apple cultivar. *Plant Pathology* 59(6): 1072–1080, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02345.x>.

Caffier, V.; Lasserre-Zuber, P.; Giraud, M.; Lascostes, M.; Stievenard, R.; Lemarquand, A.; van de Weg, E.; Expert, P.; Denancé, C.; Didelot, F.; Le Cam, B. and Durel, C.-E. 2014. Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution* 27: 481–489, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.003>.

Caffier, V.; Patocchi, A.; Expert, P.; Bellanger, M.-N.; Durel, C.-E.; Hilber-Bodmer, M.; Broggini, G.A.L.; Groenwold, R. and Bus, V.G.M. 2015. Virulence characterization of *Venturia inaequalis* reference isolates on the differential set of *Malus* hosts. *Plant Disease* 99: 370–375, <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0708-RE>.

Calenge, F.; Drouet, D.; Denancé, C.; Van de Weg, W.E.; Brisset, M.-N.; Paulin, J.-P. and Durel, C.-E. 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 128–135, <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2002-z>.

Calenge, F.; Faure, A.; Goerre, M.; Gebhardt, C.; Van de Weg, W.E.; Parisi, L. and Durel, C.-E. 2004. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94: 370–379, <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.4.370>.

Le Cam, B.; Sargent, D.; Gouzy, J.; Amselem, J.; Bellanger, M.-N.; Bouchez, O.; Brown, S.; Caffier, V.; De Gracia, M.; Debuchy, R.; Duvaux, L.; Payen, T.; Sannier, M.; Shiller, J.; Collemare, J. and Lemaire, C. 2019. Population genome sequencing of the scab fungal species *Venturia inaequalis*, *Venturia pirina*, *Venturia aucupariae* and *Venturia asperata*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 9: 2405–2414, <https://doi.org/10.1534/g3.119.400047>.

- Celton, J.-M.; Gaillard, S.; Bruneau, M.; Pelletier, S.; Aubourg, S.; Martin-Magniette, M.-L.; Navarro, L.; Laurens, F. and Renou, J.-P. 2014. Widespread anti-sense transcription in apple is correlated with siRNA production and indicates a large potential for transcriptional and/or post-transcriptional control. *New Phytologist* 203: 287–299, <https://doi.org/10.1111/nph.12787>.
- Celton, J.M.; Tustin, D.S.; Chagné, D. and Gardiner, S.E. 2009. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. *Tree Genetics and Genomes* 5: 93–107, <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0171-z>.
- Chagné, D.; Crowhurst, R.N.; Troglio, M.; Davey, M.W.; Gilmore, B.; Lawley, C.; Vanderzande, S.; Hellens, R.P.; Kumar, S.; Cestaro, A.; Velasco, R.; Main, D.; Rees, J.D.; Iezzoni, A.; Mockler, T.; Wilhelm, L.; Van de Weg, E.; Gardiner, S.E.; Bassil, N. and Peace, C. 2012. Genome-wide SNP detection, validation, and development of an 8K SNP array for apple. *PLoS ONE* 7 : e31745, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031745>.
- Charrier, A.; Vergne, E.; Dousset, N.; Richer, A.; Petiteau, A. and Chevreau, E. 2019. Efficient targeted Mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 system. *Frontiers in Plant Science* 10, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>.
- Cornille, A.; Giraud, T.; Bellard, C.; Tellier, A.; Le Cam, B.; Smulders, M.J.M.; Kleinschmit, J.; Roldan-Ruiz, I. and Gladieux, P. 2013. Postglacial recolonization history of the European crabapple (*Malus sylvestris* Mill.), a wild contributor to the domesticated apple. *Molecular Ecology* 22: 2249–2263, <https://doi.org/10.1111/mec.12231>.
- Cornille, A.; Giraud, T.; Smulders, M.J.M.; Roldán-Ruiz, I. and Gladieux, P. 2014. The domestication and evolutionary ecology of apples. *Trends in Genetics* 30: 57–65, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.10.002>.
- Cornille, A.; Gladieux, P.; Smulders, M.J.M.; Roldán-Ruiz, I.; Laurens, F.; Le Cam, B.; Nersesyan, A.; Clavel, J.; Olonova, M.; Feugey, L.; Gabrielyan, I.; Zhang, X.G.; Tenaillon, M.I. and Giraud, T. 2012. New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genetics* 8, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002703>.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16: 10881–10890, <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>.
- Costa, F.; Van De Weg, W.E.; Stella, S.; Dondini, L.; Pratesi, D.; Musacchi, S. and Sansavini, S. 2008. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*). *Tree Genetics and Genomes* 4: 575–586, <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0133-5>.
- Daccord, N.; Celton, J.-M.; Linsmith, G.; Becker, C.; Choisine, N.; Schijlen, E.; van de Geest, H.; Bianco, L.; Micheletti, D.; Velasco, R.; Di Pierro, E.A.; Gouzy, J.; Rees, D.J.G.; Guérif, P.; Muranty, H.; Durel, C.-E.; Laurens, F.; Lespinasse, Y.; Gaillard, S.; Aubourg, S.; Quesneville, H.; Weigel, D.; van de Weg, E.; Troglio, M. and Bucher, E. 2017. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development. *Nature Genetics* 49: 1099–1106, <https://doi.org/10.1038/ng.3886>.
- Dalgaard, P. 2010. R Development Core Team (2010): R: A language and environment for statistical computing Computer p, <http://www.r-project.org/>.
- Degenhardt, J.; Al-Masri, A.N.; Kürkcüoğlu, S.; Szankowski, I. and Gau, A.E. 2005. Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Molecular Genetics and Genomics* 273, <https://doi.org/10.1007/s00438-005-1136-7>.
- Deising, H.B.; Werner, S. and Wernitz, M. 2000. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* 2: 1631–1641, [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01319-8](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01319-8).
- Delplace, F.; Huard-Chauveau, C.; Dubiella, U.; Khafif, M.; Alvarez, E.; Langin, G.; Roux, F.; Peyraud, R. and Roby, D. 2020. Robustness of plant quantitative disease resistance is provided by a decentralized immune network. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117: 18099–18109, <https://doi.org/10.1073/pnas.2000078117>.

- Denancé, C.; Muranty, H.; Durel, C.-E.; Commission, E. and Biodiversité, F.R.B.– F. pour la R. sur la. 2020. MUNQ - *Malus* UNiQue genotype code for grouping apple accessions corresponding to a unique genotypic profile. Portail Data INRAE. <https://doi.org/doi/10.15454/HKGMAS>.
- Dereeper, A.; Guignon, V.; Blanc, G.; Audic, S.; Buffet, S.; Chevenet, F.; Dufayard, J.-F.; Guindon, S.; Lefort, V.; Lescot, M.; Claverie, J.-M. and Gascuel, O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* 36: W465–W469, <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>.
- Didelot, F.; Caffier, V.; Orain, G.; Lemarquand, A. and Parisi, L. 2016. Sustainable management of scab control through the integration of apple resistant cultivars in a low-fungicide input system. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 217: 41–48, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.10.023>.
- Douarre, C.; Crispim-Junior, C.F.; Gelibert, A.; Tougne, L. and Rousseau, D. 2019. Novel data augmentation strategies to boost supervised segmentation of plant disease. *Computers and Electronics in Agriculture* 165: 104967, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.104967>.
- Duan, N.; Bai, Y.; Sun, H.; Wang, N.; Ma, Y.; Li, M.; Wang, X.; Jiao, C.; Legall, N.; Mao, L.; Wan, S.; Wang, K.; He, T.; Feng, S.; Zhang, Z.; Mao, Z.; Shen, X.; Chen, X.; Jiang, Y.; Wu, S.; Yin, C.; Ge, S.; Yang, L.; Jiang, S.; Xu, H.; Liu, J.; Wang, D.; Qu, C.; Wang, Y.; Zuo, W.; Xiang, L.; Liu, C.; Zhang, D.; Gao, Y.; Xu, Y.; Xu, K.; Chao, T.; Fazio, G.; Shu, H.; Zhong, G.-Y.; Cheng, L.; Fei, Z. and Chen, X. 2017. Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communications* 8: 249, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00336-7>.
- Dubos, C.; Stracke, R.; Grotewold, E.; Weisshaar, B.; Martin, C. and Lepiniec, L. 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 15: 573–581, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>.
- Dugé de Bernonville, T.; Marolleau, B.; Staub, J.; Gaucher, M. and Brisset, M.-N. 2014. Using molecular tools to decipher the complex world of plant resistance inducers: an apple case study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 11403–11411, <https://doi.org/10.1021/jf504221x>.
- Durel, C.-E.; Denancé, C. and Brisset, M.-N. 2009. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes ‘Evereste’ and *Malus floribunda* clone. *NRC Research Press* 147: 139–147, <https://doi.org/10.1139/G08-111>.
- Durel, C.E.; Parisi, L.; Laurens, F.; Van de Weg, W.E.; Liebhard, R. and Jourjon, M.F. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome* 46: 224–234, <https://doi.org/10.1139/g02-127>.
- Durel C.E., 2019, Characterizing apple scab resistance: “the long and winding road”. XV EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium, June 3-7, 2019, Prague, Czech Rep. (invited communication).
- Emeriewen, O.F.; Richter, K.; Hanke, M.-V.; Malnoy, M. and Peil, A. 2017. Further insights into *Malus fusca* fire blight resistance. *Journal of Plant Pathology* 99:45-49, <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i0.3908>.
- Emeriewen, O.F.; Richter, K.; Piazza, S.; Micheletti, D.; Broggin, G.A.L.; Berner, T.; Keilwagen, J.; Hanke, M.-V.; Malnoy, M. and Peil, A. 2018. Towards map-based cloning of *FB_Mfu10*: identification of a receptor-like kinase candidate gene underlying the *Malus fusca* fire blight resistance locus on linkage group 10. *Molecular Breeding* 38, <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0863-5>.
- Emeriewen, O.F.; Wöhner, T.; Flachowsky, H. and Peil, A. 2019. *Malus* hosts–*Erwinia amylovora* interactions: strain pathogenicity and resistance mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 10: 1–7, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00551>.
- Fahrenttrapp, J.; Broggin, G.A.L.; Kellerhals, M.; Peil, A.; Richter, K.; Zini, E. and Gessler, C. 2013. A candidate gene for fire blight resistance in *Malus × robusta* 5 is coding for a CC–NBS–LRR. *Tree Genetics & Genomes* 9, <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0550-3>.
- Feurtey, A.; Cornille, A.; Shykoff, J.A.; Snirc, A. and Giraud, T. 2017. Crop-to-wild gene flow and its fitness consequences for a wild fruit tree: Towards a comprehensive conservation strategy of the wild apple in Europe. *Evolutionary Applications* 10: 180–188, <https://doi.org/10.1111/eva.12441>.

- Feussner, I. and Wasternack, C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology* 53(1): 275–297, <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>.
- Fiala, J.L. 1994. Flowering crabapples: the genus *Malus*. Timber Press, Portland.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology* 275–296, <https://doi.org/1971.9:275-296>.
- Forte, A. V.; Ignatov, A.N.; Ponomarenko, V. V.; Dorokhov, D.B. and Savelyev, N.I. 2002. Phylogeny of the *Malus* (apple tree) species, inferred from the morphological traits and molecular DNA analysis. *Russian Journal of Genetics* 38, <https://doi.org/10.1023/A:1020648720175>.
- Fujii, M.; Shinohara, N.; Lim, A.; Otake, T.; Kumagai, K. and Yanagisawa, Y. 2003. A study on emission of phthalate esters from plastic materials using a passive flux sampler. *Atmospheric Environment* 37: 5495–5504, <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.09.026>.
- Galli, P.; Patocchi, A.; Broggin, G.A.L. and Gessler, C. 2010. The *Rvi15 (Vr2)* Apple scab resistance locus contains three TIR-NBS-LRR genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 23, <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0608>.
- Gaucher, M. 2012. Identification par approches comparatives de facteurs moléculaires associés à la résistance ou à la sensibilité du Pommier (*Malus x domestica*) à *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien. Thèse de doctorat. VENAM Angers.
- Gaucher, M.; Dugé de Bernonville, T.; Lohou, D.; Guyot, S.; Guillemette, T.; Brisset, M.-N. and Dat, J.F. 2013. Histolocalization and physico-chemical characterization of dihydrochalcones: Insight into the role of apple major flavonoids. *Phytochemistry* 90, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.009>.
- Gaucher, M.; Lemarquand, A.; Orain, G.; Giraud, M.; Le Maguet, J.; Coureau, C.; Leblois, A.; Belleveaux, C.; Cavaignac, S.; Biargues, M.E.; Koké, E.; Bérud, M.; Crété, X.; Ondet, S.J.; Meynard, J. and Brisset, M.N. 2020. PEPS : Evaluation et optimisation de l'utilisation de stimulateurs de défense des plantes (SDP) dans les stratégies de protection phytosanitaire en verger de pommier. *Innovations Agronomiques* 79: 159–171.
- Gessler, C.; Patocchi, A.; Sansavini, S.; Tartarini, S. and Gianfranceschi, L. 2006. *Venturia inaequalis* Resistance in Apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* 473–503, <https://doi.org/10.1080/07352680601015975>.
- Giraud, H.; Cornille, A. and Pontoise, B. De. 2014. Les pérégrinations du pommier domestique. *Pour la science* 439: 36–42.
- Gladieux, P.; Zhang, X.-G.; Roldán-ruiz, I.; Caffier, V.; Leroy, T.; Devaux, M.; van Glabeke, S.; Coart, E. and Le Cam, B. 2010. Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host. *Molecular Ecology* 19: 658–674, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04498.x>.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205–227, <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>.
- Gozzo, F. and Faoro, F. 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 12473–12491, <https://doi.org/10.1021/jf404156x>.
- Gross, B.L.; Henk, A.D.; Richards, C.M.; Fazio, G. and Volk, G.M. 2014. Genetic diversity in *Malus x domestica* (Rosaceae) through time in response to domestication. *American Journal of Botany* 101(10), <https://doi.org/10.3732/ajb.1400297>.
- Harris, S.A.; Robinson, J.P. and Juniper, B.E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* 18(8), [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(02\)02689-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02689-6).
- Hassan, M.A.E. and Buchenauer, H. 2007. Induction of resistance to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 151–158.

- Hokanson, S.C.; Szewc-McFadden, A.K.; Lamboy, W.F. and McFerson, J.R. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 671–683, <https://doi.org/10.1007/s001220050943>.
- Holtappels, M.; Noben, J.-P.; Van Dijck, P. and Valcke, R. 2018. Fire blight host-pathogen interaction: proteome profiles of *Erwinia amylovora* infecting apple rootstocks. *Scientific Reports* 8(1), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30064-x>.
- Holtappels, M.; Noben, J.-P. and Valcke, R. 2016. Virulence of *Erwinia amylovora*, a prevalent apple pathogen: Outer membrane proteins and type III secreted effectors increase fitness and compromise plant defenses. *Proteomics* 16(17), <https://doi.org/10.1002/pmic.201500513>.
- Holtappels, M.; Vrancken, K.; Schoofs, H.; Deckers, T.; Remans, T.; Noben, J.P. and Valcke, R. 2015. A comparative proteome analysis reveals flagellin, chemotaxis regulated proteins and amylovoran to be involved in virulence differences between *Erwinia amylovora* strains. *Journal of Proteomics* 123, <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2015.03.036>.
- Horbach, R.; Navarro-Quesada, A.R.; Knogge, W. and Deising, H.B. 2011. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.014>.
- Howard N., 2020, Shared haplotype length data for complex pedigree reconstruction in apple. RGC10, December 9-11,16-18, 2020, Virtual 2020. (invited communication).
- Ishiga, T.; Iida, Y.; Sakata, N.; Ugajin, T.; Hirata, T.; Taniguchi, S.; Hayashi, K. and Ishiga, Y. 2020. Acibenzolar-S-methyl activates stomatal-based defense against *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* in cabbage. *Journal of General Plant Pathology* 86: 48–54, <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00883-5>.
- Jha, G.; Thakur, K. and Thakur, P. 2009. The *Venturia* apple pathosystem: Pathogenicity mechanisms and plant defense responses. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009, <https://doi.org/10.1155/2009/680160>.
- Johnson, K.B.; Smith, T.J.; Temple, T.N.; Gutierrez, E.; Elkins, R.B. and Castagnoli, S.P. 2016. Integration of acibenzolar-S-methyl with antibiotics for protection of pear and apple from fire blight caused by *Erwinia amylovora*. *Crop Protection* 88: 149–154, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.06.010>.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323–329, <https://doi.org/10.1038>.
- De Jong, H.; Reglinski, T.; Elmer, P.A.G.; Wurms, K.; Vanneste, J.L.; Guo, L.F. and Alavi, M. 2019. Integrated use of *Aureobasidium pullulans* strain CG163 and Acibenzolar-S-Methyl for management of bacterial canker in kiwifruit. *Plants* 8: 287, <https://doi.org/10.3390/plants8080287>.
- Joshi, S.G.; Schaart, J.G.; Groenwold, R.; Jacobsen, E.; Schouten, H.J. and Krens, F.A. 2011. Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology* 75: 579–591, <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9749-1>.
- Jung, S.; Cestaro, A.; Troglio, M.; Main, D.; Zheng, P.; Cho, I.; Folta, K.M.; Sosinski, B.; Abbott, A.; Celton, J.-M.; Arús, P.; Shulaev, V.; Verde, I.; Morgante, M.; Rokhsar, D.; Velasco, R. and Sargent, D. 2012. Whole genome comparisons of *Fragaria*, *Prunus* and *Malus* reveal different modes of evolution between Rosaceous subfamilies. *BMC Genomics* 13(1), <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-129>.
- Juniper, B.E. and Mabberley, D.J. 2006. *The story of the apple*. Timber Press, Portland.
- Kamber, T.; Buchmann, J.P.; Pothier, J.F.; Smits, T.H.M.; Wicker, T. and Duffy, B. 2016. Fire blight disease reactome: RNA-seq transcriptional profile of apple host plant defense responses to *Erwinia amylovora* pathogen infection. *Scientific Reports* 6(1), <https://doi.org/10.1038/srep21600>.
- Khajuria, Y.P.; Kaul, S.; Wani, A.A. and Dhar, M.K. 2018. Genetics of resistance in apple against *Venturia inaequalis* (Wint.) Cke. *Tree Genetics & Genomes* 14: 16, <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1226-4>.

- Khan, M.A.; Duffy, B.; Gessler, C. and Patocchi, A. 2006. QTL mapping of fire blight resistance in apple. *Molecular Breeding* 17:299-306, <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9000-y>.
- Khan, M.A.; Durel, C.E.; Duffy, B.; Drouet, D.; Kellerhals, M.; Gessler, C. and Patocchi, A. 2007. Development of molecular markers linked to the “Fiesta” linkage group 7 major QTL for fire blight resistance and their application for marker-assisted selection. *Genome* 50: 568–577, <https://doi.org/10.1139/G07-033>.
- Knogge, W. 1998. Fungal pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 324–328.
- Koornneef, A. and Pieterse, C.M.J. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology* 146: 839–844, <https://doi.org/10.1104/pp.107.112029>.
- Kouzai, Y.; Noutoshi, Y.; Inoue, K.; Shimizu, M.; Onda, Y. and Mochida, K. 2018. Benzothiadiazole, a plant defense inducer, negatively regulates sheath blight resistance in *Brachypodium distachyon*. *Scientific Reports* 8: 1–7, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35790-w>.
- Kraepiel, Y. and Barny, M.-A. 2016. Gram-negative phytopathogenic bacteria, all hemibiotrophs after all? *Molecular Plant Pathology* 17(3), <https://doi.org/10.1111/mpp.12345>.
- Kumar, J.; Singh, D.; Ghosh, P. and Kumar, A. 2017. Endophytic and epiphytic modes of microbial interactions and benefits jay. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* 1:1-657, <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5813-4>.
- Laloi, G. 2016. Etude du pyramidage de résistances quantitatives du pommier à la tavelure. Thèse de doctorat. VENAM Angers.
- Laloi, G.; Vergne, E.; Durel, C.E.; Le Cam, B. and Caffier, V. 2017. Efficiency of pyramiding of three quantitative resistance loci to apple scab. *Plant Pathology* 66: 412–422, <https://doi.org/10.1111/ppa.12581>.
- Lamport, D.T.A.; Kieliszewski, M.J.; Chen, Y. and Cannon, M.C. 2011. Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiology* 156: 11–19, <https://doi.org/10.1104/pp.110.169011>.
- Lasserre-Zuber, P.; Caffier, V.; Stievenard, R.; Lemarquand, A.; Le Cam, B. and Durel, C.-E. 2018. Pyramiding quantitative resistance with a major resistance gene in apple: from ephemeral to enduring effectiveness in controlling scab. *Plant Disease* 102: 2220–2223, <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1759-RE>.
- Lassois, L.; Denancé, C.; Ravon, E.; Guyader, A.; Guisnel, R.; Hibrand-Saint-Oyant, L.; Poncet, C.; Lasserre-Zuber, P.; Feugey, L. and Durel, C.E. 2016. Genetic diversity, population structure, parentage analysis, and construction of core collections in the french apple germplasm based on SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 34: 827–844, <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0966-7>.
- Lê Van, A.; Caffier, V.; Lasserre-Zuber, P.; Chauveau, A.; Brunel, D.; Le Cam, B. and Durel, C.-E. 2013. Differential selection pressures exerted by host resistance quantitative trait loci on a pathogen population: a case study in an apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *New Phytologist* 197: 899–908, <https://doi.org/10.1111/nph.12086>.
- Lê Van, A.; Gladieux, P.; Lemaire, C.; Cornille, A.; Giraud, T.; Durel, C.; Caffier, V. and Le Cam, B. 2012. Evolution of pathogenicity traits in the apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. *Evolutionary Applications* 5(7): 694–704, <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00246.x>.
- Lefrancq, B. and Lateur, M. 2009. Monitoring and occurrence of new races of *Venturia inaequalis* on apple in Belgium. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 74(3): 623–631, <http://europepmc.org/abstract/MED/20222544>.
- Leser, C. and Treutter, D. 2005. Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiologia Plantarum* 123: 49–56, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00427.x>.
- Lespinasse, Y.; Durel, C.-E.; Parisi, L.; Laurens, F.; Chevalier, M. and Pinet, C. 2000. Durable resistance of apple to scab and Powdery-mildew: one step more toward an environmental friendly orchard. *IOBC-WPRE Bulletin* 3:257-260.

- Li, C.; Wei, M.; Ge, Y.; Zhao, J.; Chen, Y.; Hou, J.; Cheng, Y.; Chen, J. and Li, J. 2020. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reactive oxygen species metabolism in apple exocarp induced by acibenzolar-S-methyl. *Food Chemistry* 308: 125663, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125663>.
- Liebhart, R.; Gianfranceschi, L.; Koller, B.; Ryder, C.D.; Tarchini, R.; Van De Weg, E. and Gessler, C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* 10: 217–241, <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0159-3>, 2002.
- Liebhart, R.; Koller, B.; Patocchi, A.; Kellerhals, M.; Pfammatter, W.; Jermini, M. and Gessler, C. 2003. Mapping quantitative field resistance against apple scab in a “Fiesta” x “Discovery” progeny. *Phytopathology* 93: 493–501, <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.493>.
- Liu, Y.; He, J.; Chen, Z.; Ren, X.; Hong, X. and Gong, Z. 2010. ABA overly-sensitive 5 (ABO5), encoding a pentatricopeptide repeat protein required for cis-splicing of mitochondrial nad2 intron 3, is involved in the abscisic acid response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 63: 749–765, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04280.x>.
- MacHardy, W.E. and others. 1996. Apple scab: biology, epidemiology, and management. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
- Madhuri, S.; Jan, M.; Aranka, G.S.; Van der Burgh, A.; van Kaauwen, M.P.W.; Tomic, L.; Groenwold, R.; Velasco, R.; van de Weg, E. and Schouten, H.J. 2014. Fine mapping of the gene *Rvi18* (*V25*) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding. *Mol Breeding* 18: 2021–2032, <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0159-3>.
- Maisonneuve, B.; Allen-aubouard, C. and Pitrat, M. 2013. Effect of plant genotype on the efficacy of stimulators of plant defences in two horticultural pathosystems. *IOBC-WPRE Bulletin* 89: 327–331.
- Mäkelä, M.R.; Donofrio, N. and de Vries, R.P. 2014. Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genetics and Biology* 72, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.010>.
- Malnoy, M.; Martens, S.; Norelli, J.L.; Barny, M.-A.; Sundin, G.W.; Smits, T.H.M. and Duffy, B. 2012. Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host. *Annual Review of Phytopathology* 50: 475–494, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172931>.
- Malnoy, M.; Xu, M.; Borejsza-Wysocka, E.; Korban, S.S. and Aldwinckle, H.S. 2008. Two receptor-like genes, *Vfa1* and *Vfa2*, confer resistance to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* inciting apple scab disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 21, <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-4-0448>.
- Mansoor, S.; Sharma, V.; Mir, M.A.; Mir, J.I.; un Nabi, S.; Ahmed, N.; Alkahtani, J.; Alwahibi, M.S. and Masoodi, K.Z. 2020. Quantification of polyphenolic compounds and relative gene expression studies of phenylpropanoid pathway in apple (*Malus domestica* Borkh) in response to *Venturia inaequalis* infection. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27(12), <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.007>.
- Marolleau, B.; Gaucher, M.; Heintz, C.; Degrave, A.; Warneys, R.; Orain, G.; Lemarquand, A. and Brisset, M. 2017. When a plant resistance inducer leaves the lab for the field: integrating ASM into routine apple protection practices. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–11, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01938>.
- Matsuo, Y.; Novianti, F.; Takehara, M.; Fukuhara, T.; Arie, T. and Komatsu, K. 2019. Acibenzolar-s-methyl restricts infection of *nicotiana benthamiana* by *plantago asiatica* mosaic virus at two distinct stages. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32: 1475–1486, <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-19-0087-R>.
- Maxson-stein, K.; He, S.; Hammerschmidt, R. and Jones, A.L. 2002. Effect of treating apple trees with Acibenzolar-S-Methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes. *Plant Disease* 86: 785–790.
- McDonald, B.A. and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349–379, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto.40.120501.101443>.

- McMullen, M.D.; Byrne, P.F.; Snook, M.E.; Wiseman, B.R.; Lee, E.A.; Widstrom, N.W. and Coe, E.H. 1998. Quantitative trait loci and metabolic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 1996–2000, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.1996>.
- Mendgen, K. and Hahn, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 7: 352–356, [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02297-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02297-5).
- Meng, S.; Torto-Alalibo, T.; Chibucos, M.C.; Tyler, B.M. and Dean, R.A. 2009. Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms. *BMC Microbiology* 9: 1–11, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-S1-S7>.
- Muranty, H.; Denancé, C.; Feugey, L.; Crépin, J.-L.; Barbier, Y.; Tartarini, S.; Ordidge, M.; Troggio, M.; Lateur, M.; Nybom, H.; Paprstein, F.; Laurens, F. and Durel, C.-E. 2020. Using whole-genome SNP data to reconstruct a large multi-generation pedigree in apple germplasm. *BMC Plant Biology* 20(1), <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2171-6>.
- Muranty, H.; Troggio, M.; Sadok, I. Ben; Rifai, M. Al; Auwerkerken, A.; Banchi, E.; Velasco, R.; Stevanato, P.; van de Weg, W.E.; Di Guardo, M.; Kumar, S.; Laurens, F. and Bink, M.C.A.M. 2015. Accuracy and responses of genomic selection on key traits in apple breeding. *Horticulture Research* 2(1), <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.60>.
- Nicholson, R.L. 1973. Response of Detached Apple Leaves to *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 63(5), <https://doi.org/10.1094/Phyto-63-649>.
- Niks, R.E.; Qi, X. and Marcel, T.C. 2015. Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annual Review of Phytopathology* 53: 445–470, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-115928>.
- Nishitani, C.; Hirai, N.; Komori, S.; Wada, M.; Okada, K.; Osakabe, K.; Yamamoto, T. and Osakabe, Y. 2016. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6: 31481, <https://doi.org/10.1038/srep31481>.
- Norelli, J.L.; Farrell, R.E.; Bassett, C.L.; Baldo, A.M.; Lalli, D.A.; Aldwinckle, H.S. and Wisniewski, M.E. 2009. Rapid transcriptional response of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridization analysis. *Tree Genetics & Genomes* 5(1), <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0164-y>.
- Oh, C.S. and Beer, S. V. 2005. Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* 253: 185–192, <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.051>.
- Oliveira, M.D.M.; Varanda, C.M.R. and Félix, M.R.F. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters* 15: 152–158, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.12.011>.
- Olivon, F.; Elie, N.; Grelier, G.; Roussi, F.; Litaudon, M. and Touboul, D. 2018. MetGem software for the generation of molecular networks based on the t-SNE algorithm. *Analytical Chemistry* 90: 13900–13908, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03099>.
- Van Ooijen, J. 2006. JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Wageningen, the Netherlands: Kyazma BV.
- Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B. and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107: 19–28, <https://doi.org/10.1023/A:1008760518772>.
- Pal, K.K. and McSpadden Gardener, B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor* 1–25, <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>.
- Panstruga, R. 2003. Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 320–326, [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00043-8).

- Papp, D.; Singh, J.; Gadoury, D. and Khan, A. 2020. New north american isolates of *Venturia inaequalis* can overcome apple scab resistance of *Malus floribunda* 821. *Plant Disease* 104: 649–655, <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2082-RE>.
- Paris, R.; Cova, V.; Pagliarani, G.; Tartarini, S.; Komjanc, M. and Sansavini, S. 2009. Expression profiling in *HcrVf2*-transformed apple plants in response to *Venturia inaequalis*. *Tree Genetics & Genomes* 5: 81–91, <https://doi.org/10.1007/s11295-008-0177-6>.
- Parisi, L. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* 83: 533, <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-533>.
- Parisi, L.; Fouillet, V.; Schouten, H.J.; Groenwold, R.; Laurens, F.; Didelot, F.; Evans, K.; Fischer, C.; Gennari, F.; Kemp, H.; Lateur, M.; Patocchi, A.; Thissen, J. and Tsipouridis, C. 2004. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae* 663: 107–114.
- Parlevliet, J.E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124: 147–156, <https://doi.org/10.1023/A:1015601731446>.
- Parlevliet, J.E. and Zadoks, J.C. 1977. The integrated concept of disease resistance: A new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* 26 : 5–21, <https://doi.org/10.1007/BF00032062>.
- Parravicini, G.; Gessler, C.; Denancé, C.; Lasserre-Zuber, P.; Vergne, E.; Brisset, M.-N.; Patocchi, A.; Durel, C.-E. and Broggini, G.A.L. 2011. Identification of serine/threonine kinase and nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar ‘Evereste.’ *Molecular Plant Pathology* 12(5), <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00690.x>.
- Patocchi, A.; Bigler, B.; Koller, B.; Kellerhals, M. and Gessler, C. 2004. *Vr2*: A new apple scab resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1087-1092, <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1723-8>.
- Patocchi, A.; Wehrli, A.; Dubuis, P.-H.; Auwerkerken, A.; Leida, C.; Cipriani, G.; Passey, T.; Staples, M.; Didelot, F.; Phillion, V.; Peil, A.; Laszakovits, H.; Rühmer, T.; Boeck, K.; Baniulis, D.; Strasser, K.; Vávra, R.; Guerra, W.; Masny, S.; Ruess, F.; Le Berre, F.; Nybom, H.; Tartarini, S.; Spornberger, A.; Pikunova, A. and Bus, V.G.M. 2020. Ten years of VINQUEST: First insight for breeding new apple cultivars with durable apple scab resistance. *Plant Disease* 104: 2074–2081, <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2473-SR>.
- Paulin, J.P. and Samson, R. 1973. Fire blight in France. II. Characters of the strains of *Erwinia amylovora* (Burril) Winslow et al., 1920, isolated from a Franco-Belgian focus. *Ann. Phytopathol.* 5: 389–397.
- Pawlowski, M.L.; Bowen, C.R.; Hill, C.B. and Hartman, G.L. 2016. Responses of soybean genotypes to pathogen infection after the application of elicitors. *Crop Protection* 87: 78–84, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.022>.
- Peace, C.P. 2017. DNA-informed breeding of rosaceous crops: promises, progress and prospects. *Horticulture Research* 4: 17006, <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.6>.
- Peace, C.P.; Bianco, L.; Troglio, M.; van de Weg, E.; Howard, N.P.; Cornille, A.; Durel, C.-E.; Myles, S.; Migicovsky, Z.; Schaffer, R.J.; Costes, E.; Fazio, G.; Yamane, H.; van Nocker, S.; Gottschalk, C.; Costa, F.; Chagné, D.; Zhang, X.; Patocchi, A.; Gardiner, S.E.; Hardner, C.; Kumar, S.; Laurens, F.; Bucher, E.; Main, D.; Jung, S. and Vanderzande, S. 2019. Apple whole genome sequences: recent advances and new prospects. *Horticulture Research* 6: 59, <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0141-7>.
- Peace C.P. 2020, Tracking the origins of valuable alleles. RGC10, December 9-11,16-18, 2020, Virtual 2020. (invited communication).
- Peil, A.; Bus, V.; Geider, K.; Richter, K.; Flachowsky, H. and Hanke, M.-V. 2009. Improvement of fire blight resistance in apple and pear. *Int J Plant Breed* 3: 1–27.
- Peil, A.; Emeriewen, O.F.; Khan, A.; Kostick, S. and Malnoy, M. 2020. Status of fire blight resistance breeding in *Malus*. *Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00581-8>.

- Peil, A.; Garcia-Libreros, T.; Richter, K.; Trognitz, F.C.; Trognitz, B.; Hanke, M.-V. and Flachowsky, H. 2007. Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breeding* 126(5), <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01408.x>.
- Perfect, S.E. and Green, J.R. 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* 2: 101–108, <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2001.00055.x>.
- Petkovsek, M.M.; Slatnar, A.; Stampar, F. and Veberic, R. 2011. Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biologia Plantarum* 55, <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0176-6>.
- Petkovšek, M.M.; Štampar, F. and Veberič, R. 2009. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 60–67, <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.09.003>.
- Phipps, J.B.; Robertson, K.R.; Smith, P.G. and Rohrer, J.R. 1990. A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany* 68(10), <https://doi.org/10.1139/b90-288>.
- Di Pierro, E.A.; Gianfranceschi, L.; Di Guardo, M.; Koehorst-van Putten, H.J.; Kruisselbrink, J.W.; Longhi, S.; Troglio, M.; Bianco, L.; Muranty, H.; Pagliarani, G.; Tartarini, S.; Letschka, T.; Lozano Luis, L.; Garkava-Gustavsson, L.; Micheletti, D.; Bink, M.C.; Voorrips, R.E.; Aziz, E.; Velasco, R.; Laurens, F. and van de Weg, W.E. 2016. A high-density, multi-parental SNP genetic map on apple validates a new mapping approach for outcrossing species. *Horticulture Research* 3: 16057, <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.57>.
- Pilet-Nayel, M.-L.; Moury, B.; Caffier, V.; Montarry, J.; Kerlan, M.-C.; Fournet, S.; Durel, C.-E. and Delourme, R. 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–9, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01838>.
- Plissonneau, C.; Benevenuto, J.; Mohd-Assaad, N.; Fouché, S.; Hartmann, F.E. and Croll, D. 2017. Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. *Frontiers in Plant Science* 8, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00119>.
- Plotnikova, J. and Ausubel, F.M. 2007. Chapter 2 - Structural basis of plant-pathogen interactions. *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. Elsevier B.V 49-73., <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52132-3.50005-5>.
- Poland, J.A.; Balint-Kurti, P.J.; Wisser, R.J.; Pratt, R.C. and Nelson, R.J. 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* 14: 21–29, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.006>.
- Pompili, V.; Dalla Costa, L.; Piazza, S.; Pindo, M. and Malnoy, M. 2020. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnology Journal* 18: 845–858, <https://doi.org/10.1111/pbi.13253>.
- Pontais, I.; Treutter, D.; Paulin, J.-P. and Brisset, M.-N. 2008. *Erwinia amylovora* modifies phenolic profiles of susceptible and resistant apple through its type III secretion system. *Physiologia Plantarum* 132(3), <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01004.x>.
- Pratt, C. and others. 1990. *Apple trees: morphology and anatomy*. 12. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.
- Raffaele, S.; Leger, A. and Roby, D. 2009. Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens. *Plant Signaling and Behavior* 4: 94–99, <https://doi.org/10.4161/psb.4.2.7580>.
- Raikhel, N. V.; Palevitz, B.A. and Haigler, C.H. 1986. Abscisic acid control of lectin accumulation in wheat seedlings and callus cultures. *Plant Physiology* 80: 167–171, <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.167>.
- REX Consortium. 2016. Combining selective pressures to enhance the durability of disease resistance genes. *Frontiers in Plant Science* 7, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01916>.
- Robinson, J.P.; Harris, S.A. and Juniper, B.E. 2001. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Systematics and Evolution* 226(1–2), <https://doi.org/10.1007/s006060170072>.

- Robinson, P. 2007. Evaluation of the new active in the product Bion plant activator seed treatment. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. <https://apvma.gov.au/node/13576>.
- da Rocha, A.B. and Hammerschmidt, R. 2005. History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *HortTechnology* 15: 518–529, <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.15.3.0518>.
- Rodríguez-Álvarez, M.X.; Boer, M.P.; van Eeuwijk, F.A. and Eilers, P.H.C. 2018. Correcting for spatial heterogeneity in plant breeding experiments with P-splines. *Spatial Statistics* 23: 52–71, <https://doi.org/10.1016/j.spasta.2017.10.003>.
- Romero, A.M.; Kousik, C.S. and Ritchie, D.F. 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by Acibenzolar-S-Methyl. *Plant Disease* 77: 189–194.
- Roth, M.; Muranty, H.; Di Guardo, M.; Guerra, W.; Patocchi, A. and Costa, F. 2020. Genomic prediction of fruit texture and training population optimization towards the application of genomic selection in apple. *Horticulture Research* 7: 148, <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00370-5>.
- Roux, F.; Voisin, D.; Badet, T.; Balagué, C.; Barlet, X.; Huard-Chauveau, C.; Roby, D. and Raffaele, S. 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* 15(5), <https://doi.org/10.1111/mpp.12138>.
- Le Roux, P.M.F.; Khan, M.A.; Broggin, G.A.L.; Duffy, B.; Gessler, C. and Patocchi, A. 2010. Mapping of quantitative trait loci for fire blight resistance in the apple cultivars “Florina” and “Nova Easygro.” *Genome* 53: 710–722, <https://doi.org/10.1139/G10-047>.
- Sarkate, A.; Saini, S.S.; Teotia, D.; Gaid, M.; Mir, J.I.; Roy, P.; Agrawal, P.K. and Sircar, D. 2018. Comparative metabolomics of scab-resistant and susceptible apple cell cultures in response to scab fungus elicitor treatment. *Scientific Reports* 8(1), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36237-y>.
- Schafer, W. 1994. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Ann Rev. Phytopathol.* 461–477.
- Schouten, H.J.; Brinkhuis, J.; van der Burgh, A.; Schaart, J.G.; Groenwold, R.; Broggin, G.A.L. and Gessler, C. 2014. Cloning and functional characterization of the *Rvi15* (*Vr2*) gene for apple scab resistance. *Tree Genetics & Genomes* 10(2), <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0678-9>.
- Segura, V.; Vilhjálmsson, B.J.; Platt, A.; Korte, A.; Seren, Ü.; Long, Q. and Nordborg, M. 2012. An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. *Nature Genetics* 44: 825–830, <https://doi.org/10.1038/ng.2314>.
- Shah, J. and Chaturvedi, R. 2009. Lipid Signals in Plant-Pathogen Interactions. In *Annual Plant Reviews* online, pp. 292–333. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0370>.
- Shahini Sough, F.; Keshavarzi, M.; Hassanzade, N.; Hashemi, M.; Abdollahi, H. and Tawosi, M. 2010. In vitro evaluation of Acybenzolar-S-Methyl on inhibition of fire blight in apple cv. Golden Delicious. *Iran. J. Plant Path.* 46: 77–78.
- Sharma, K.; Butz, A.F. and Finckh, M.R. 2010. Effects of host and pathogen genotypes on inducibility of resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 59: 1062–1071, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02341.x>.
- Shrestha, A.; Khan, A. and Dey, N. 2018. cis–trans engineering: advances and perspectives on customized transcriptional regulation in plants. *Molecular Plant* 11: 886–898, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.05.008>.
- Silfverberg-Dilworth, E.; Matasci, C.L.; Van De Weg, W.E.; Van Kaauwen, M.P.W.; Walser, M.; Kodde, L.P.; Soglio, V.; Gianfranceschi, L.; Durel, C.E.; Costa, F.; Yamamoto, T.; Koller, B.; Gessler, C. and Patocchi, A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomes* 2: 202–224, <https://doi.org/10.1007/s11295-006-0045-1>.

- Soriano, J.M.; Madduri, M.; Schaart, J.G.; van der Burgh, A.; van Kaauwen, M.P.W.; Tomic, L.; Groenwold, R.; Velasco, R.; van de Weg, E. and Schouten, H.J. 2014. Fine mapping of the gene *Rvi18* (V25) for broad-spectrum resistance to apple scab, and development of a linked SSR marker suitable for marker-assisted breeding. *Molecular Breeding* 34: 2021–2032, <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0159-3>.
- Soufflet-Freslon, V.; Gianfranceschi, L.; Patocchi, A. and Durel, C.-E. 2008. Inheritance studies of apple scab resistance and identification of *Rvi14*, a new major gene that acts together with other broad-spectrum QTL. *Genome* 51: 657–667, <https://doi.org/10.1139/G08-046>.
- Su, Y.Y.; Qi, Y.L. and Cai, L. 2012. Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. *Mycology* 3: 195–200, <https://doi.org/10.1080/21501203.2012.719042>.
- Thakur, M. and Sohal, B.S. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry* 2013 :1-10.
- Thaler, J.S.; Fidantsef, A.L. and Bostock, R.M. 2002. Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: Effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Journal of Chemical Ecology* 28: 1131–1159, <https://doi.org/10.1023/A:1016225515936>.
- Tripathi, D.; Jiang, Y. and Kumar, D. 2010. SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Letters* 584: 3458–3463, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.046>.
- Tsuda, K.; Sato, M.; Stoddard, T.; Glazebrook, J. and Katagiri, F. 2009. Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genetics* 5: e1000772, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000772>.
- Upchurch, R.G. 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* 30: 967–977, <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9639-z>.
- Urrestarazu, J.; Denancé, C.; Ravon, E.; Guyader, A.; Guisnel, R.; Feugey, L.; Poncet, C.; Lateur, M.; Houben, P.; Ordidge, M.; Fernandez-Fernandez, F.; Evans, K.M.; Paprstein, F.; Sedlak, J.; Nybom, H.; Garkava-Gustavsson, L.; Miranda, C.; Gassmann, J.; Kellerhals, M.; Suprun, I.; Pikunova, A. V.; Krasova, N.G.; Torutaeva, E.; Dondini, L.; Tartarini, S.; Laurens, F. and Durel, C.-E. 2016. Analysis of the genetic diversity and structure across a wide range of germplasm reveals prominent gene flow in apple at the European level. *BMC Plant Biology* 16: 130, <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0818-0>.
- Vallad, G.E. and Goodman, R.M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44: 1920–1934, [https://doi.org/44:1920–1934](https://doi.org/44:1920-1934).
- Vanneste, J. 2000. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia Amylovora*. Wallingford, UK: CABI Publ.
- Velasco, R.; Zharkikh, A.; Affourtit, J.; Dhingra, A.; Cestaro, A.; Kalyanaraman, A.; Fontana, P.; Bhatnagar, S.K.; Troggio, M.; Pruss, D.; Salvi, S.; Pindo, M.; Baldi, P.; Castelletti, S.; Cavaiuolo, M.; Coppola, G.; Costa, F.; Cova, V.; Dal Ri, A.; Goremykin, V.; Komjanc, M.; Longhi, S.; Magnago, P.; Malacarne, G.; Malnoy, M.; Micheletti, D.; Moretto, M.; Perazzolli, M.; Si-Ammour, A.; Vezzulli, S.; Zini, E.; Eldredge, G.; Fitzgerald, L.M.; Gutin, N.; Lanchbury, J.; Macalma, T.; Mitchell, J.T.; Reid, J.; Wardell, B.; Kodira, C.; Chen, Z.; Desany, B.; Niazi, F.; Palmer, M.; Koepke, T.; Jiwan, D.; Schaeffer, S.; Krishnan, V.; Wu, C.; Chu, V.T.; King, S.T.; Vick, J.; Tao, Q.; Mraz, A.; Stormo, A.; Stormo, K.; Bogden, R.; Ederle, D.; Stella, A.; Vecchiotti, A.; Kater, M.M.; Masiero, S.; Lasserre, P.; Lespinasse, Y.; Allan, A.C.; Bus, V.; Chagné, D.; Crowhurst, R.N.; Gleave, A.P.; Lavezzo, E.; Fawcett, J.A.; Proost, S.; Rouzé, P.; Sterck, L.; Toppo, S.; Lazzari, B.; Hellens, R.P.; Durel, C.-E.; Gutin, A.; Bumgarner, R.E.; Gardiner, S.E.; Skolnick, M.; Egholm, M.; Van de Peer, Y.; Salamini, F. and Viola, R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42: 833–839, <https://doi.org/10.1038/ng.654>.
- Venisse, J.-S.; Malnoy, M.; Faize, M.; Paulin, J.-P. and Brisset, M.-N. 2002. Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 15(12), <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.12.1204>.

- Vergne, E.; Grand, X.; Ballini, E.; Chalvon, V.; Saindrenan, P.; Tharreau, D. and Nottéghem, J. 2010. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. BMC Plant Biology 10: 206.
- Villas-Bôas, S.G.; Mas, S.; Åkesson, M.; Smedsgaard, J. and Nielsen, J. 2005. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrometry Reviews 24(5), <https://doi.org/10.1002/mas.20032>.
- Vinatzer, B.A.; Patocchi, A.; Tartarini, S.; Gianfranceschi, L.; Sansavini, S. and Gessler, C. 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. Plant Breeding 123: 321–326, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00973.x>.
- Walters, D.R.; Ratsep, J. and Havis, N.D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. Journal of Experimental Botany 64: 1263–1280, <https://doi.org/10.1093/jxb/ert026>.
- Wannemuehler, S.D.; Luby, J.J.; Yue, C.; Bedford, D.S.; Gallardo, R.K. and McCracken, V.A. 2019. A cost–benefit analysis of DNA informed apple breeding. HortScience 54: 1998–2004, <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14173-19>.
- Warneys, R.; Gaucher, M.; Robert, P.; Aligon, S.; Anton, S.; Aubourg, S.; Barthes, N.; Braud, F.; Cournol, R.; Gadenne, C.; Heintz, C.; Brisset, M.-N. and Degraeve, A. 2018. Acibenzolar-S-Methyl Reprograms Apple Transcriptome Toward Resistance to Rosy Apple Aphid. Frontiers in Plant Science 9: 1–16, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01795>.
- Webster, A.D.; Vaughan, S.P.; Lucas, A.S.; Spencer, J.E. and Atkinson, C.J. 2003. Effects of tree age at planting, root manipulation and trickle irrigation on growth and cropping of apple (*Malus pumila*) cultivar Queen Cox on M.9 rootstock. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78(5), <https://doi.org/10.1080/14620316.2003.11511684>.
- van de Weg, E.; Di Guardo, M.; Jänsch, M.; Socquet-Juglard, D.; Costa, F.; Baumgartner, I.; Broggini, G.A.L.; Kellerhals, M.; Troglio, M.; Laurens, F.; Durel, C.-E. and Patocchi, A. 2018. Epistatic fire blight resistance QTL alleles in the apple cultivar ‘Enterprise’ and selection X-6398 discovered and characterized through pedigree-informed analysis. Molecular Breeding 38: 5, <https://doi.org/10.1007/s11032-017-0755-0>.
- van de Weg, E.; Di Guardo, M.; Jänsch, M.; Socquet-juglard, D.; Costa, F.; Baumgartner, I.; Broggini, G.A.L.; Kellerhals, M.; Troglio, M.; Laurens, F.; Durel, C.-E. and Patocchi, A. 2018. Epistatic fire blight resistance QTL alleles in the apple cultivar ‘Enterprise’ and selection X-6398 discovered and characterized through pedigree-informed analysis. Mol Breeding 38:1.
- Wei, G. and Shirsat, A.H. 2006. Extensin over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasiveness. Molecular Plant Pathology 7: 579–592, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00363.x>.
- Wiesel, L.; Newton, A.C.; Elliott, I.; Booty, D.; Gilroy, E.M.; Birch, P.R.J. and Hein, I. 2014. Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. Frontiers in Plant Science 5: 1–13, <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>.
- Win, J.; Greenwood, D.R. and Plummer, K.M. 2003. Characterisation of a protein from *Venturia inaequalis* that induces necrosis in *Malus* carrying the *Vm* resistance gene. Physiological and Molecular Plant Pathology 62(4), [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00061-4).
- Wöhner, T.W.; Flachowsky, H.; Richter, K.; Garcia-Libreros, T.; Trognitz, F.; Hanke, M. V. and Peil, A. 2014. QTL mapping of fire blight resistance in *Malus xrobusta* 5 after inoculation with different strains of *Erwinia amylovora*. Molecular Breeding 34: 217–230, <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0031-5>.
- Wöhner, T.W.; Richter, K.; Sundin, G.W.; Zhao, Y.; Stockwell, V.O.; Sellmann, J.; Flachowsky, H.; Hanke, M. V. and Peil, A. 2018. Inoculation of *Malus* genotypes with a set of *Erwinia amylovora* strains indicates a gene-for-gene relationship between the effector gene *eop1* and both *Malus floribunda* 821 and *Malus* ‘Evereste.’ Plant Pathology 67: 938–947, <https://doi.org/10.1111/ppa.12784>.

- Xia, J.; Psychogios, N.; Young, N. and Wishart, D.S. 2009. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research* 37: W652–W660, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp356>.
- Xu, M. and Korban, S.S. 2002. A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* 162: 1995, <http://www.genetics.org/content/162/4/1995.abstract>.
- Yamamoto, T.; Kimura, T.; Saito, T.; Kotobuki, K.; Matsuta, N.; Liebhard, R.; Gessler, C.; Van De Weg, W.E. and Hayashi, T. 2004. Genetic linkage maps of japanese and european pears aligned to the apple consensus map. *Acta Horticulturae* 663: 51–56, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.663.2>.
- Yoshida, Y. 2001. Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA Research* 8: 115–122, <https://doi.org/10.1093/dnares/8.3.115>.
- Youssef, K.; Roberto, S.; Colombo, R.; Canteri, M. and Elsalam, K. 2019. Acibenzolar-S-methyl against *Botrytis* mold on table grapes in vitro and in vivo. *Agronomy Science and Biotechnology* 5: 52, <https://doi.org/10.33158/ASB.2019v5i1p52>.
- Zajicova, I.; Tihlarikova, E.; Cifrova, P.; Kyjakova, P.; Nedela, V.; Sechet, J.; Havelkova, L.; Kloutvorova, J. and Schwarzerova, K. 2019. Analysis of apple epidermis in respect to ontogenic resistance against *Venturia inaequalis*. *Biologia plantarum* 63: 662–670, <https://doi.org/10.32615/bp.2019.134>.
- Zhang, L.; Hu, J.; Han, X.; Li, J.; Gao, Y.; Richards, C.M.; Zhang, C.; Tian, Y.; Liu, G.; Gul, H.; Wang, D.; Tian, Y.; Yang, C.; Meng, M.; Yuan, G.; Kang, G.; Wu, Y.; Wang, K.; Zhang, H.; Wang, D. and Cong, P. 2019. A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour. *Nature Communications* 10: 1494, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09518-x>.
- Zhang, Y.-L.; Zhang, C.-L.; Wang, G.-L.; Wang, Y.-X.; Qi, C.-H.; Zhao, Q.; You, C.-X.; Li, Y.-Y. and Hao, Y.-J. 2019. The R2R3 MYB transcription factor MdMYB30 modulates plant resistance against pathogens by regulating cuticular wax biosynthesis. *BMC Plant Biology* 19: 362, <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1918-4>.
- Ziadi, S.; Poupard, P.; Brisset, M.; Paulin, J.-P. and Simoneau, P. 2001. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 33–43, <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0343>

Titre : Résistances du pommier à la tavelure et au feu bactérien : interactions entre les résistances génétiques et induites par les SDP

Mots clés : *Malus domestica*, *Venturia inaequalis*, *Erwinia amylovora*, résistance génétique, résistance induite, mécanismes d'interaction

Résumé : Diversifier les méthodes de protection des cultures est un enjeu majeur pour réduire l'utilisation de pesticides. Le déploiement de variétés génétiquement résistantes et les stimulateurs de défense des plantes (SDP) sont deux méthodes de protection alternatives prometteuses mais qui peuvent être individuellement rapidement contournées ou d'efficacité partielle et variable. L'utilisation combinée de ces deux types de résistances a été envisagée pour s'affranchir de ces limites et développer une stratégie intégrée de protection durable du pommier.

Le pommier est l'une des cultures les plus traitées, du fait de variétés commerciales majoritairement sensibles aux bioagresseurs. Cette étude a visé deux maladies majeures : la tavelure (*Venturia inaequalis*) et le feu bactérien (*Erwinia amylovora*). Une descendance F1 dans laquelle ségrègent des QTLs de résistance, ainsi qu'une collection de variétés anciennes ont été utilisées. Quatre produits SDP ont été testés mais plus particulièrement l'Acibenzolar-S-Methyl, un analogue de l'acide salicylique.

La complémentarité des résistances génétiques et induites a été explorée par des approches phénotypiques et génétiques afin de comprendre la nature de l'interaction entre ces résistances et les facteurs pouvant l'influencer. En complément, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces résistances ont été explorés par des approches transcriptionnelles et de métabolomique.

La combinaison de ces résistances s'avère être complémentaire et très efficace pour la protection des pommiers mais ne fait pas intervenir de modulation forte de l'effet des QTLs de résistance. La signalisation par les acides salicyliques et jasmoniques, les flavonoïdes et les acides gras semblent jouer un rôle dans ces résistances. Les résultats obtenus ouvrent des premières pistes pour l'élaboration de modèles conceptuels et mécanistiques de l'interaction entre les résistances génétiques et induites par les SDP.

Title: Apple resistances to scab and fire blight: interactions between genetic and PRI-induced resistances

Keywords: *Malus domestica*, *Venturia inaequalis*, *Erwinia amylovora*, genetic resistance, induced resistance, interaction mechanisms

Abstract : Diversifying crop protection methods is a main challenge to reduce the use of pesticides. Deploying genetically resistant varieties and spraying plant resistances inducer (PRI) are two promising alternative protection methods, but, individually, they are often quickly overcome or have partial and variable efficacy. The combined use of these two types of resistance has been considered for going beyond such limitations and developing an integrated strategy for sustainable protection.

Apple is one of the most treated crops, because most of commercial varieties are susceptible to several diseases. This study targeted two major diseases: apple scab (*Venturia inaequalis*) and fire blight (*Erwinia amylovora*). An F1 progeny segregating for resistance QTLs and a collection of old varieties were used. Four PRI products were tested but more particularly Acibenzolar-S-Methyl, a salicylic acid analogue.

The complementarity of genetic and induced resistances was first explored by phenotypic and genetic approaches in order to understand their interaction pattern and the influencing factors. In addition, the molecular mechanisms involved in both resistances have been explored through transcriptional and metabolomic approaches.

The combination of both resistances is complementary and very effective for the protection of apple, but it does not exhibit a strong modulation of QTL effects. Salicylic and jasmonic acids signaling, flavonoids and fatty acids seem to play a role in these resistances. The gained results open leads for the elaboration of conceptual and mechanistic models describing the interactions between genetic and PRI-induced resistances.

