

Mise en évidence de gènes de résistance partielle à la tavelure

Héloïse Bastiaanse

Introduction

- ▶ La tavelure, principale maladie en vergers de pommiers
- ▶ Importance des sources de résistance polygénique
 - Contournement des gènes majeurs de résistance
 - Réduction de l'emploi de fongicides
- ▶ Mécanismes biologiques de la résistance partielle peu connus

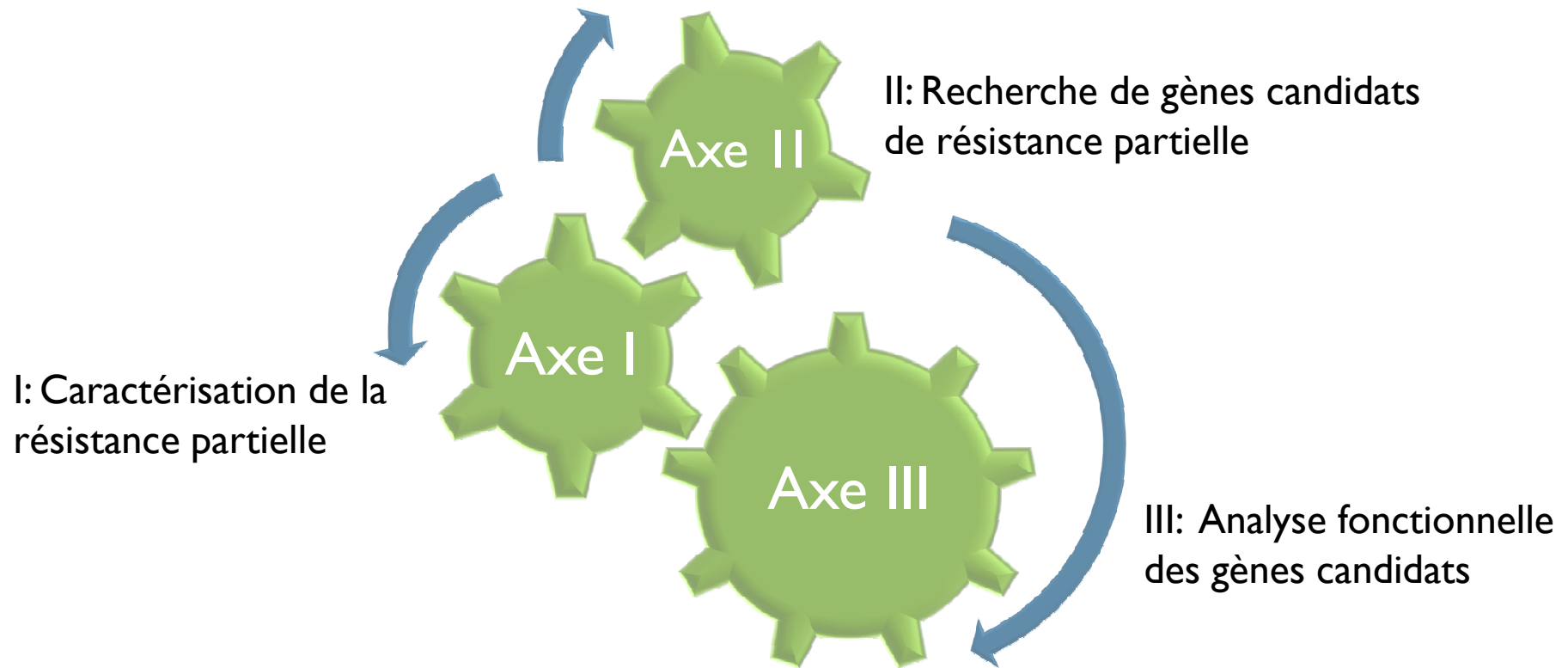


Objectifs

- ▶ Etudier le déterminisme génétique d'une source de résistance partielle à la tavelure
 - Meilleure compréhension des mécanismes biologiques et moléculaires
 - Développement de marqueurs de sélection



Méthodologie générale



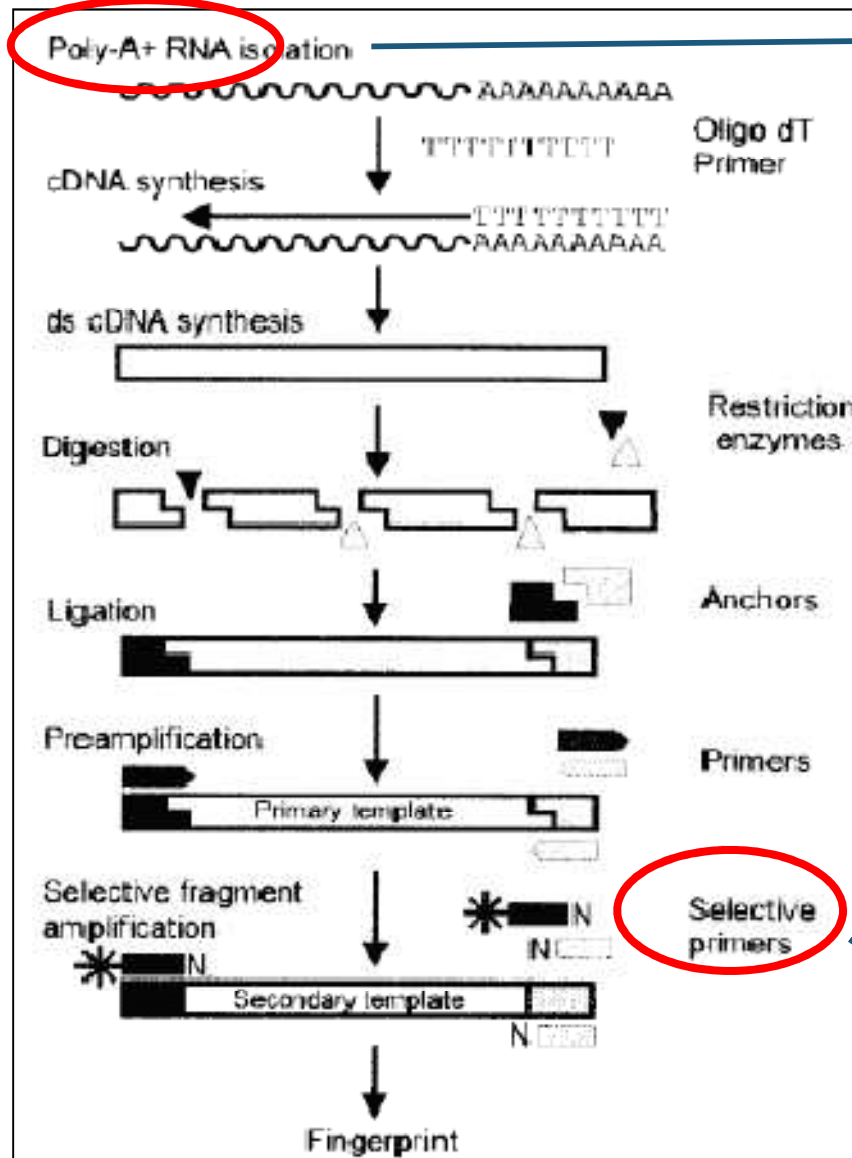
Caractérisation de la résistance partielle

- ▶ Choix de la variété *Président Roulin*
- ▶ Mécanismes originaux de résistance à la tavelure
 - Réactions de défenses de type chlorose-nécrose
 - Arrêt précoce du développement du stroma
- ▶ Bonne transmission du caractère de résistance à la descendance



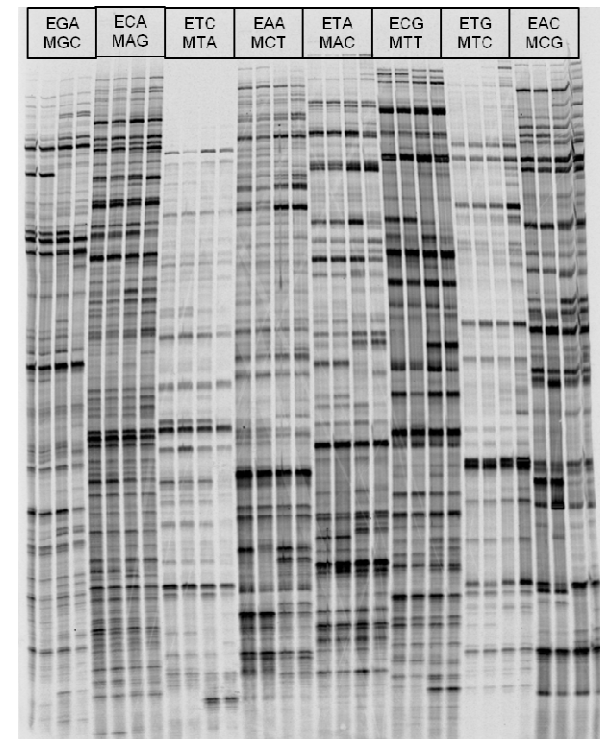
Recherche de gènes candidats de résistance

- Analyse de l'expression différentielle de gènes: la cDNA-AFLP



Matériel de départ: ARNm

→ Analyse de l'expression différentielle de gènes



Nombreuses combinaisons possibles

Recherche de gènes candidats de résistance

► Analyse de l'expression différentielle de gènes: la cDNA-AFLP

4 modèles de comparaison:

1. *Président Roulin* (R) infectée
2. *Président Roulin* (R) saine
3. *Gala* (S) infectée
4. *Gala* (S) saine

Avantages:

- Technique sans à priori
- Reproductible
- Sensible
- Appliquée avec succès chez le pommier

Inconvénients

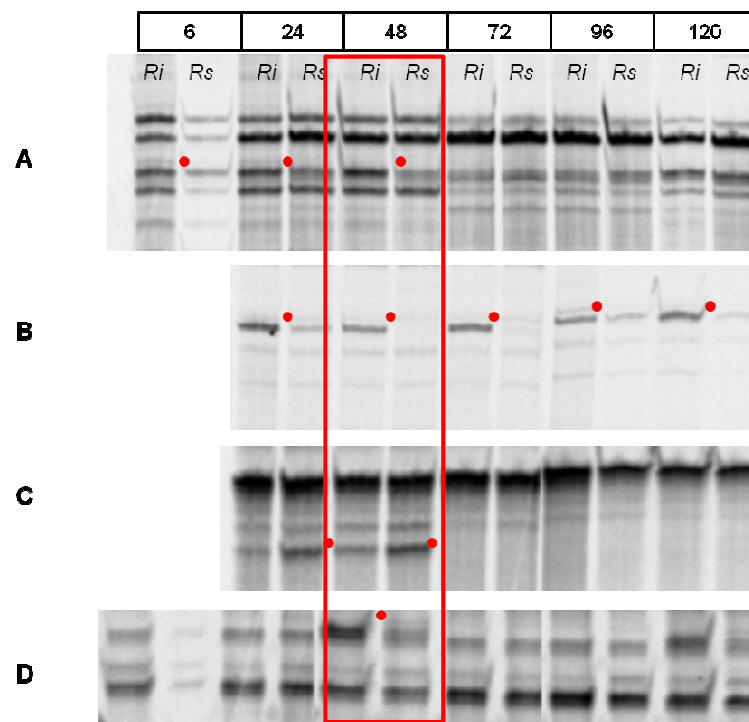
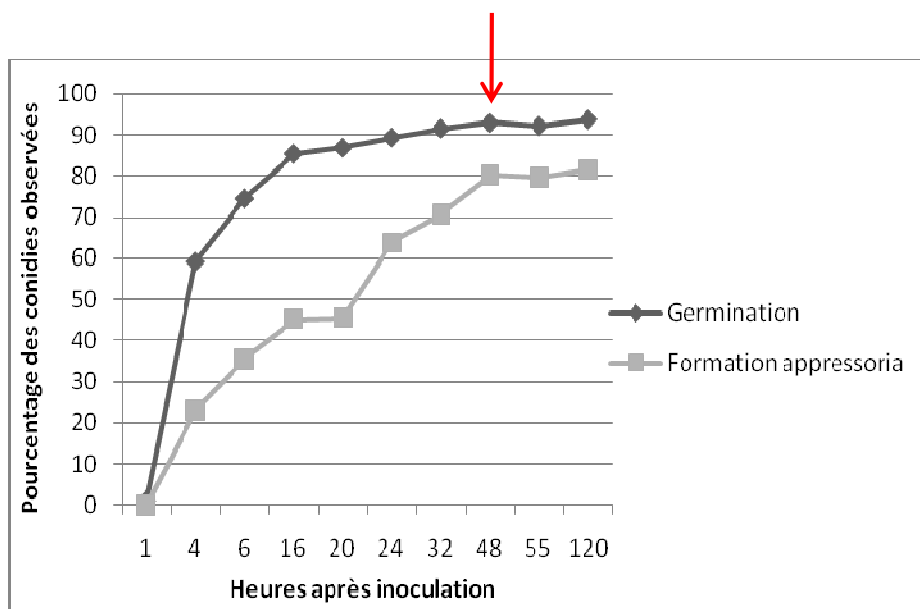
- Technique laborieuse
- Nécessite une confirmation



Mise au point de la cDNA-AFLP

Temps de prélèvement des ARN totaux

- ▶ Prélèvement des ARN à 48 hr après inoculation
 - ▶ Etude de cinétique de développement du pathogène
 - ▶ Profils AFLP à différents temps d'observation



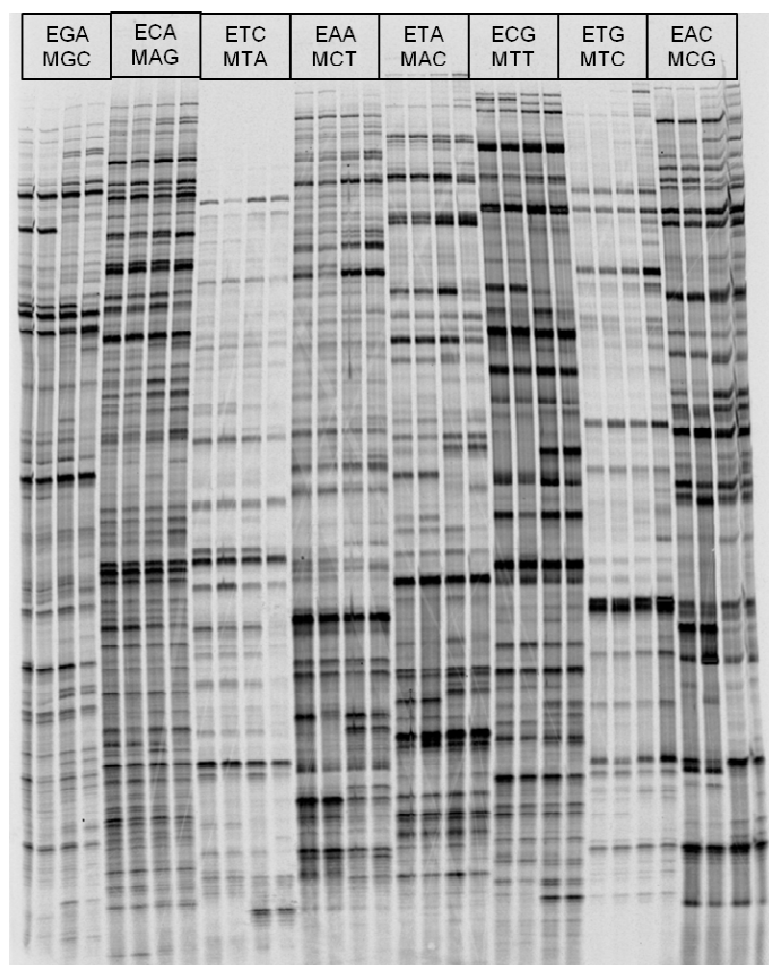
Application de la cDNA-AFLP

4 modèles de comparaison:

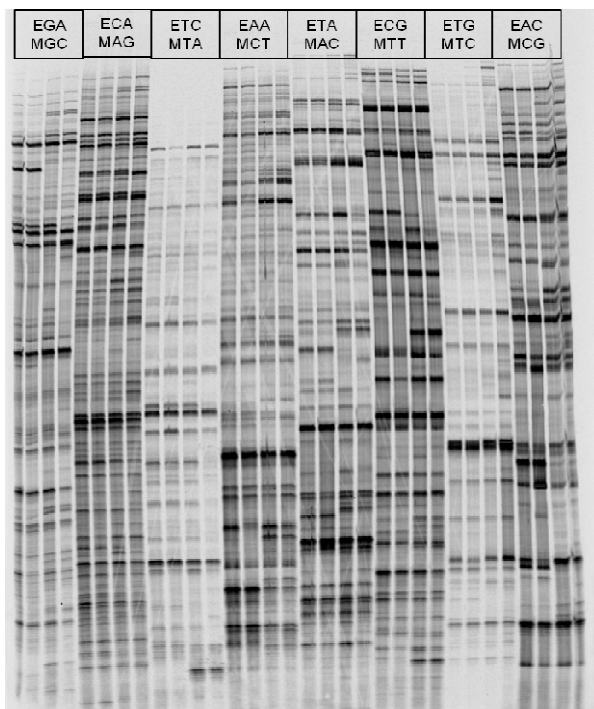
1. *Président Roulin* (R) infectée
2. *Président Roulin* (R) saine
3. *Gala* (S) infectée
4. *Gala* (S) saine

Extraction d'ARNm

48h après inoculation



Application de la cDNA-AFLP



- ▶ 155 couples d'amorces sélectives testés

140 couples avec des profils d'amplification exploitables
Amplification d'environ 10250 fragments de 30 à 800pb
L'analyse AFLP couvre environ 20% du transcriptome

- ▶ Environ 800 fragments différentiellement exprimés

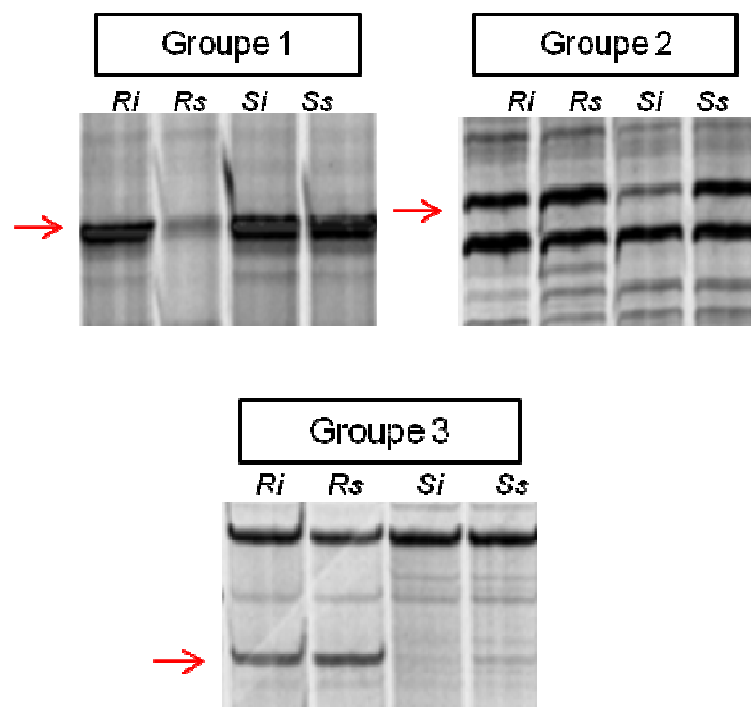
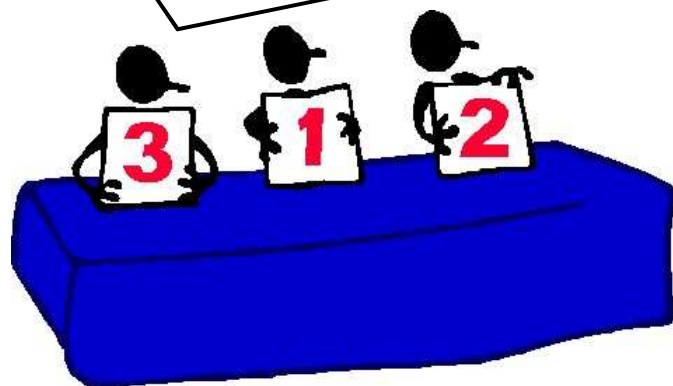
Application de la cDNA-AFLP

Analyse des gels

- ▶ 150 couples de primers testés sur les échantillons
- ▶ 800 fragments différentiellement exprimés

- ▶ Groupes de comparaisons:

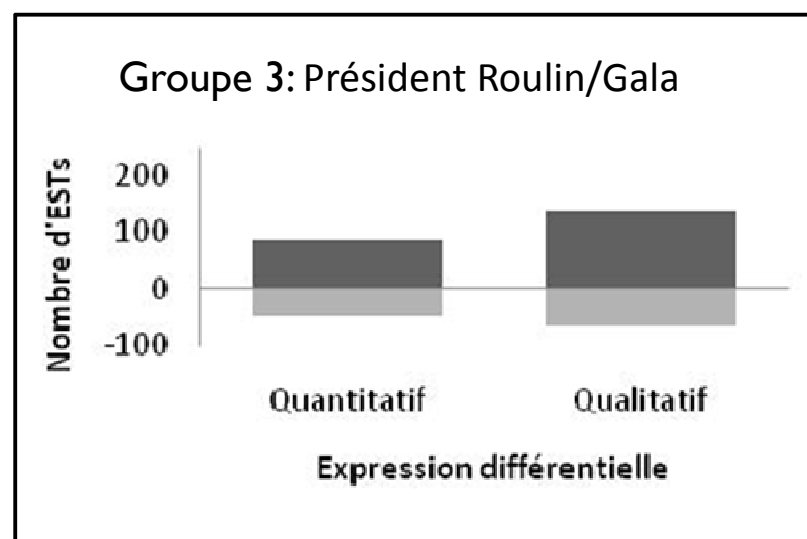
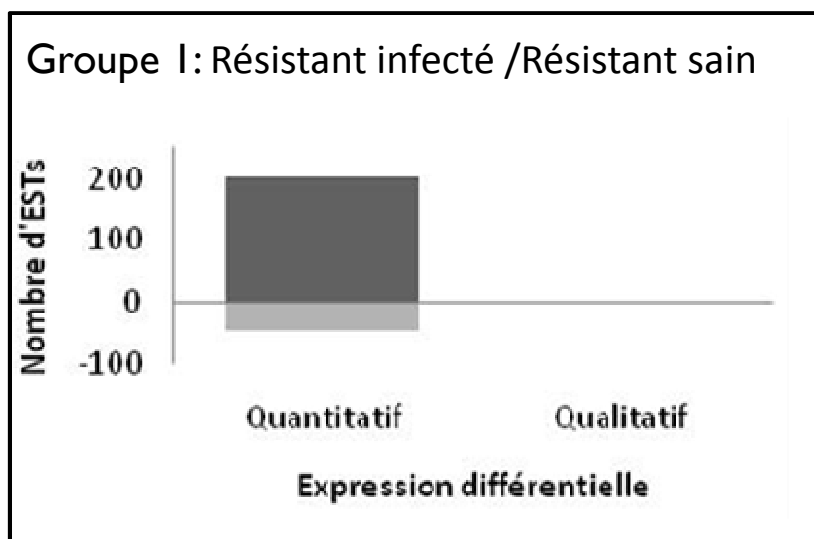
- 1: Résistant infecté / Résistant sain
2: Sensible infecté / Sensible sain
3: Résistant / Sensible



Application de la cDNA-AFLP

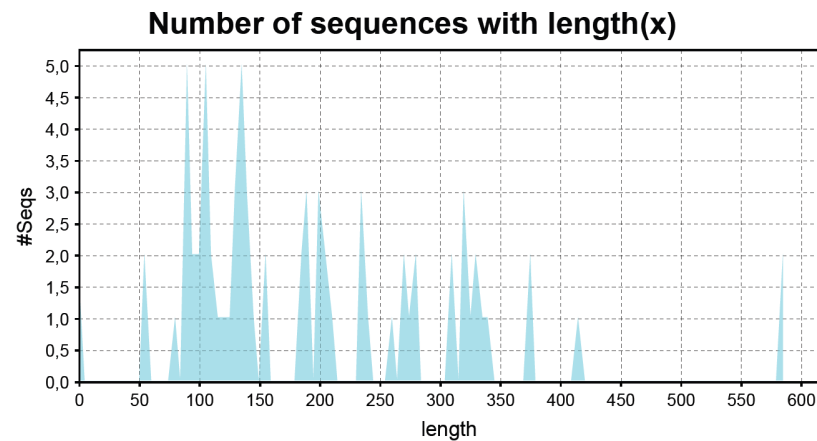
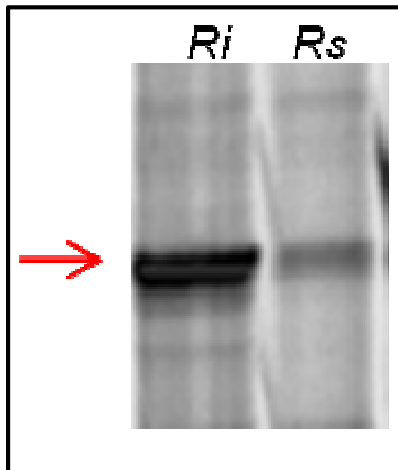
Analyse des gels

- ▶ 800 fragments différentiellement exprimés
- ▶ Les différences d'expression sont essentiellement quantitatives
- ▶ Différences de type présence/absence: uniquement entre les 2 variétés
- ▶ 98% de bandes communes entre les deux variétés



Clonage et séquençage des fragments d'intérêt


- Séquençage de 53 fragments exprimés chez la variété résistante après inoculation (2 clones par fragment)
 - 50 à 600pb



Annotation des séquences

► Annotation via Blast2GO

- Recherches d'homologies dans les bases de données du NCBI:
homologies significatives mises en évidence pour 55% des séquences

```
>  emb|CAN68201.1 hypothetical protein [Vitis vinifera]
Length=579

Score = 144 bits (364), Expect = 3e-33
Identities = 71/79 (90%), Positives = 72/79 (92%), Gaps = 0/79 (0%)
Frame = +2

Query 2 SKKVSPKVPTGSYNIAQIAYELNVLGTRGPRRMHCHMSIPVSSLDAGSTVPGQPELLTR 181
Sbjct 291 SKKVSPKVPTGSYNIA I YELNVLGTRGPRRMHC MHSIP SSLDAG +VPGQPELL R 350

Query 182 ALEDSFRSISFSKSLDHSV 238
Sbjct 351 ALEDSFRSISFS SLDHSV
Query 182 ALEDSFRSISFSKSLDHSV 238
Sbjct 351 ALEDSFRSISFSNSLDHSV 369
```

Fonction biologique des fragments séquencés

► Recherche bibliographique

La synthèse de protéines PR

- *Thaumatococcus*-like protein (TLP) (**IAU6I** et **38BU5**)
 - Sur-exprimée chez la variété résistante infectée
- Protéine associée à la pathogénèse végétale (PR-5)
- Identifiées notamment chez le pommier en réponse à *V. inaequalis* (**Gau et al., 2004, Degenhardt et al., 2005**)
 - Accumulation de protéines TLP chez la variété sensible *Elstar*
 - Hauts taux constitutifs chez la variété résistante *Rémo*

Autres fonctions métaboliques liées aux mécanismes de résistance



- ▶ L'hypersensibilité
 - ▶ *Cystéines protéase* (2 fragments)

- ▶ Un analogue de gène de résistance
 - ▶ *Leucine-rich Repeat Transmembrane Protein Kinase* (2 fragments)

- ▶ ...

Conclusions

- ▶ La cDNA-AFLP
 - ▶ Adaptée à la mise en évidence de fragments induits ou réprimés par *V. inaequalis*
- ▶ Grande similitude entre le transcriptome de deux variétés de pommiers
 - ▶ 98% de fragments AFLP communs
- ▶ Modification de l'expression de 2% des transcrits par *V. inaequalis* (sur les 20% du transcriptome visualisés par l'AFLP)
- ▶ Des homologues de séquence avec des gènes de résistance ont été trouvés

Perspectives

- ▶ Poursuite de l'annotation des séquences induites chez la variété résistante suite à l'infection (**250 fragments**)
- ▶ Confirmation de l'expression différentielle par PCR en temps réel à différents temps de l'infection
- ▶ Analyse fonctionnelle des gènes dans la population *Gala X Roulin*

