



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2011/06/24
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2011/12/29
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 2012/12/21
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2011/051470
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2011/161388
 (30) Priorité/Priority: 2010/06/24 (FR1055042)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)
 (71) Demandeur/Applicant:
 INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
 AGRONOMIQUE - INRA, FR
 (72) Inventeurs/Inventors:
 BRISSET, MARIE-NOELLE, FR;
 DUGE DE BERNONVILLE, THOMAS, FR
 (74) Agent: GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) Titre : DISPOSITIF POUR DETERMINER OU ETUDIER L'ETAT DE STIMULATION DES DEFENSES NATURELLES DE PLANTES OU PARTIES DE PLANTES
 (54) Title: DEVICE FOR DETERMINING OR STUDYING THE STATE OF STIMULATION OF THE NATURAL DEFENCES OF PLANTS OR PORTIONS OF PLANTS

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne un dispositif pour déterminer ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou parties de plantes, appartenant avantageusement à la famille des Rosaceae. Le dispositif correspondant comprend pour cela des moyens de détermination du niveau d'expression, dans un échantillon de plantes ou parties de plantes, d'au moins un gène cible dans chacun des groupes (a) à (i) suivants : (a) PR-1, PR- 2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15; (b) PAL, CHS, DFR, ANS, PPO; (c) HMGR, FPPS, Far; (d) CSL; (e) APOX, GST, POX; (f) CalS, Pect, CAD; (g) EDS1, WRKY; (h) LOX2, JAR; et (i) ACCO, EIN3. De préférence, ce dispositif consiste en une trousse contenant des moyens de détermination sous forme de paires d'amorces pour la mise en œuvre d'une technique de PCR quantitative.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 décembre 2011 (29.12.2011)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/161388 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/051470
- (22) Date de dépôt international :
24 juin 2011 (24.06.2011)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1055042 24 juin 2010 (24.06.2010) FR
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE - INRA [FR/FR]; 147 Rue de
l'Université, F-75007 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : BRISSET,
Marie-Noëlle [FR/FR]; 15, rue de Rivoli, F-49000
Angers (FR). DUGE DE BERNONVILLE, Thomas
[FR/FR]; 7 Impasse du Bois du Lys, F-49320 Saint-
Saturnin Sur Loire (FR).
- (74) Mandataires : ORSINI, Fabienne et al.; Cabinet
HARLE et PHELIP, 14-16 Rue Ballu, F-75009 Paris
(FR).
- (81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Déclarations en vertu de la règle 4.17 :
— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))*
- Publiée :
— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*
— *avec la partie de la description réservée au listing des
séquences (règle 5.2.a))*

(54) Title : DEVICE FOR DETERMINING OR STUDYING THE STATE OF STIMULATION OF THE NATURAL DEFENCES OF PLANTS OR PORTIONS OF PLANTS

(54) Titre : DISPOSITIF POUR DETERMINER OU ETUDIER L'ETAT DE STIMULATION DES DEFENSES NATURELLES DE PLANTES OU PARTIES DE PLANTES

(57) Abstract : The present invention relates to a device for determining or studying the state of stimulation of the natural defences of plants or portions of plants, said plants advantageously belonging to the Rosaceae family. For this purpose, the corresponding device includes a means for determining, in a sample of plants or portions of plants, the level of expression of at least one target gene in each of the following groups (a) to (i): (a) PR-1, PR- 2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15; (b) PAL, CHS, DFR, ANS, PPO; (c) HMGR, FPPS, Far; (d) CSL; (e) APOX, GST, POX; (f) CalS, Pect, CAD; (g) EDS1, WRKY; (h) LOX2, JAR; and (i) ACCO, EIN3. Said device preferably consists of a kit which contains a determination means in the form of pairs of primers for implementing a quantitative PCR technique.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un dispositif pour déterminer ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou parties de plantes, appartenant avantageusement à la famille des Rosaceae. Le dispositif correspondant comprend pour cela des moyens de détermination du niveau d'expression, dans un échantillon de plantes ou parties de plantes, d'au moins un gène cible dans chacun des groupes (a) à (i) suivants : (a) PR-1, PR- 2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15; (b) PAL, CHS, DFR, ANS, PPO; (c) HMGR, FPPS, Far; (d) CSL; (e) APOX, GST, POX; (f) CalS, Pect, CAD; (g) EDS1, WRKY; (h) LOX2, JAR; et (i) ACCO, EIN3. De préférence, ce dispositif consiste en une trousse contenant des moyens de détermination sous forme de paires d'amorces pour la mise en œuvre d'une technique de PCR quantitative.



WO 2011/161388 A1

DISPOSITIF POUR DETERMINER OU ETUDIER L'ETAT DE STIMULATION DES DEFENSES NATURELLES DE PLANTES OU PARTIES DE PLANTES

Domaine de l'invention

La présente invention concerne le domaine des dispositifs pour déterminer et/ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes.

Plus précisément, cette invention concerne un dispositif comprenant des moyens pour déterminer le niveau ou profil d'expression d'une combinaison déterminée de gènes cibles endogènes dans des plantes ou des parties de plantes, de sorte à identifier la présence, le niveau et/ou l'intensité de la stimulation des défenses naturelles desdites plantes ou parties de plantes.

Art antérieur

Les plantes sont exposées à de multiples agressions, lesdites agressions englobant les événements consistant en des stress dits « abiotiques » (sécheresse, température extrême, rayonnements ultraviolets, etc.) et des stress dits « biotiques » (virus, bactéries, champignons, ravageurs, etc.).

Il est connu que les plantes possèdent une pluralité de mécanismes endogènes qui sont capables d'offrir une défense efficace à l'encontre d'un panel large de tels stress.

Dans le cas de stress biotiques, trois niveaux de mécanismes de défense peuvent se développer de manière spatio-temporelle à partir du point d'infection ou d'infestation, et concourir à freiner la propagation de la maladie.

Sur le site de pénétration du pathogène, les cellules en contact avec l'agent pathogène peuvent s'autodétruire et retarder ainsi sa progression ; ce premier phénomène de défense est connu sous l'appellation de réaction d'hypersensibilité (HR).

A partir du site d'infection, des signaux d'alertes peuvent être transmis aux cellules avoisinantes, ce qui crée une zone locale de résistance acquise, où s'accumulent de nombreux composés de défense ; ce second niveau de défense assure une résistance acquise locale (LAR).

Des signaux peuvent également être transmis à la plante entière, ce qui induit un troisième niveau de défense : la résistance acquise systémique (SAR).

Des phénomènes ou voies physiologiques bien caractérisés des mécanismes de défense inductibles par les agents pathogènes, impliqués dans les niveaux de défense LAR et SAR, sont par exemple :

(i) la production de composés anti-microbiens, telles que les protéines relatives aux pathogènes (couramment dénommées « protéines PR » ou « PRP ») et les phytoalexines,
(ii) le renforcement des parois cellulaires (dépôt de callose, lignification, réticulation de protéines), et

(iii) la production de certaines hormones de plantes, notamment l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET), lesdites hormones jouant un rôle important dans la signalisation des mécanismes de défense induits par les stress.

5 En plus de ces réactions de défense induites par le stress, l'induction de la SAR confère, à la plante, la capacité de résister à des attaques ultérieures, y compris dans des localisations distantes par rapport au premier site d'infection ou d'infestation dans ladite plante.

10 Il peut arriver que les mécanismes de défenses ne soient pas activés de manière complète, mais que les tissus soient seulement « sensibilisés ». Une expression plus rapide et renforcée des mécanismes de défense n'est déclenchée qu'après exposition de la plante à un stress ultérieur. Ce phénomène est couramment dénommé « priming » ou « potentialisation ».

Cette connaissance approfondie des mécanismes de défense des plantes a permis le développement et l'utilisation de produits phytosanitaires, qui n'agissent plus directement sur la cause du stress, mais qui présentent la propriété d'agir indirectement par l'activation et la stimulation des mécanismes de défense naturelle.

15 De tels produits à effet stimulateur des défenses naturelles (encore dénommés « stimulateurs des défenses naturelles » ou sous l'acronyme « SDN ») peuvent être classés selon deux principales familles :

(i) les composés dits « stimulateurs directs », qui entraînent, une fois appliqués sur la plante, une activation complète des réactions de défense, qu'il y ait ou non présence de pathogènes, et
20 (ii) les composés dits « potentialisateurs », qui déclenchent, après application sur la plante, uniquement le phénomène de « potentialisation » précité (les réactions de défense ne s'activant qu'à la suite d'une attaque par un agent pathogène ou un stress).

La plupart de ces produits SDN sont encore connus sous l'appellation de « éliciteurs » (ou « éliciter ») ou encore de « inducteurs de résistance ».

25 De nombreuses études ont été menées sur ces mécanismes de défense, et les produits à effet stimulateur des défenses naturelles, à partir d'espèces modèles, en particulier à partir de *Arabidopsis thaliana*.

On précise toutefois qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de cadre réglementaire spécifique régissant les conditions de mise sur le marché et d'utilisation des produits SDN.

30 Ainsi, pour bénéficier d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), de tels produits SDN peuvent entrer (i) tels quels, dans la catégorie des intrants phytopharmaceutiques, ou (ii) en mélange avec des molécules fertilisantes, dans la catégorie des intrants fertilisants.

Très peu d'AMM pour intrants phytopharmaceutiques ont été délivrées à ce jour pour des produits SDN.

35 Concernant plus spécifiquement la connaissance des effets de ces intrants sur les plantes, la stimulation des défenses naturelles est généralement étudiée seulement à une échelle cellulaire, par exemple sur suspensions cellulaires ou sur organes détachés.

A la connaissance de la demanderesse, un effet de stimulation des défenses naturelles au niveau moléculaire sur les plantes entières n'est généralement pas été démontré.

A l'inverse, on connaît une grande diversité de produits homologués comme intrants phytopharmaceutiques ou comme intrants fertilisants, qui seraient susceptibles d'exercer aussi une action de stimulation des défenses naturelles de plantes, bien qu'une telle activité additionnelle n'ait pas été démontrée ou identifiée.

5 Certains produits pourraient également avoir un effet inhibiteur des défenses naturelles de plantes.

La situation exposée ci-dessus pour les plantes en général, se retrouve notamment pour les plantes de la famille des *Rosaceae* qui inclut diverses espèces fruitières.

10 Il existe par conséquent un besoin pour la mise à disposition des professionnels d'un dispositif ou d'outil polyvalent qui permettrait d'identifier, de manière simple et rapide, l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou de parties de plantes, notamment de la famille des *Rosaceae*.

15 Ce dispositif ou outil polyvalent aurait également avantageusement comme objectif de permettre le criblage des substances pour leurs propriétés de stimulation des défenses naturelles des plantes, y compris de plantes appartenant à la famille des *Rosaceae*.

Un tel dispositif ou outil devrait en particulier offrir la possibilité de réaliser une discrimination entre (i) les produits SDN qui activent effectivement les défenses des plantes, et (ii) les produits qui sont dépourvus d'un tel effet.

20 Ce dispositif ou outil permettrait ainsi le réaliser le criblage de nouveaux produits SDN et d'effectuer des études diverses sur les SDN, par exemple des études visant à déterminer le ou les mécanismes(s) d'action et/ou la ou les voies moléculaires impliqués dans l'effet de stimulation des défenses d'une plante par un produit SDN particulier, par une combinaison particulière de produits SDN, ou encore par une combinaison entre un ou plusieurs produits SDN avec un ou plusieurs autres intrants susceptibles de présenter une action antagoniste sur
25 la stimulation des défenses.

Résumé de l'invention

30 La présente invention est relative à un dispositif pour déterminer ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou parties de plantes, lequel dispositif comprend des moyens de détermination du niveau d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon de plantes ou parties de plantes, lesdits moyens de détermination comprenant :

(a) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15 ;

35 (b) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : PAL, CHS, DFR, ANS, PPO ;

(c) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : HMGR, FPPS, Far ;

(d) un moyen de détermination du niveau d'expression du gène cible CSL ;

(e) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes suivants : APOX, GST, POX ;

(f) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : CalS, Pect, CAD ;

5 (g) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : EDS1, WRKY ;

(h) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : LOX2, JAR ;

10 (i) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : ACCO, EIN3.

Dans certains modes de réalisation, ledit dispositif comprend les moyens de détermination du niveau d'expression de la combinaison des gènes cibles suivants : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO, EIN3.

15 Dans certains modes de réalisation, lesdits moyens de détermination du niveau d'expression d'un gène cible sont choisis parmi (i) les fragments d'acide nucléique capables de s'hybrider de manière spécifique aux ARNm exprimés par ledit gène cible ou aux ADNc correspondants, ou à des fragments desdits ARNm ou desdits ADNc, et/ou (ii) les anticorps se liant spécifiquement aux produits d'expression dudit gène cible, desdits ARNm ou desdits
20 ADNc, ou fragments desdits produits d'expression.

Dans certains modes de réalisation, les fragments d'acide nucléique capables de s'hybrider de manière spécifique aux ARNm exprimés par ledit gène cible ou aux ADNc correspondants consistent en des amorces, lesdites amorces étant préférentiellement choisies parmi les séquences suivantes SEQ ID n°32 à 87.

25 La présente invention est également relative à un procédé pour identifier un profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles permettant de déterminer, ou au moins d'évaluer, un état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou de parties de plantes, lequel procédé comprend les étapes suivantes :

30 (i) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles au moyen du dispositif précité, sur un ensemble de plantes ou de parties de plantes, dont l'état de stimulation de leurs défenses naturelles est connu, puis

(ii) déterminer un profil d'expression de ladite combinaison de gènes cibles correspondant à un état déterminé de stimulation des défenses naturelles desdites plantes ou parties de plantes, partant des données issues de l'étape (i).

35 L'invention concerne aussi un procédé pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie de plante, comprenant les étapes suivantes :

(i) prélever un échantillon à partir de ladite plante ou de ladite partie de plante,

(ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans ledit échantillon prélevé à l'étape (i), au moyen du dispositif précité,

(iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence,

(iv) déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles de ladite plante ou de ladite partie de plante, à partir dudit profil d'expression obtenu lors de l'étape (ii).

La présente invention concerne encore un procédé pour sélectionner une substance ayant la propriété de moduler l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie de plante, comprenant les étapes suivantes :

(i) mettre en contact ladite plante ou ladite partie de plante avec la substance à tester,

(ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon prélevé à partir de ladite plante ou de ladite partie de plante suite à l'étape (i), au moyen du dispositif précité,

(iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence, pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles dans ledit échantillon,

(iv) sélectionner positivement ladite substance si la comparaison à l'étape (iii) montre que ladite substance testée à l'étape (i) module l'état de stimulation des défenses naturelles de ladite plante ou de ladite partie de plante.

La présente invention a aussi trait à un procédé pour sélectionner une plante présentant un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de leur conférer une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt, comprenant les étapes suivantes :

(i) appliquer ledit ou lesdits stress à une plante ou une partie de plante,

(ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon prélevé à partir de la plante ou de ladite partie de plante, au moyen du dispositif précité,

(iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence, pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles dans ledit échantillon,

(iv) sélectionner positivement ladite plante ou ladite partie de plante si la comparaison de l'étape (iii) montre que ladite plante ou ladite partie de plante possède un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de leur conférer une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt.

Description détaillée de l'invention

Les inventeurs ont identifié un ensemble spécifique de gènes cibles, dont le niveau ou profil d'expression constitue un moyen simple et efficace pour déterminer et/ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes, avantageusement des plantes de la famille des *Rosaceae*.

Les inventeurs ont en effet mis en évidence que l'analyse de l'expression d'une combinaison spécifique de gènes cibles permet de déterminer l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes qui sont (i) exposées à un produit SDN, (ii) exposées à une

source ou un évènement de stress biotique, (iii) exposées à une source ou un évènement de stress abiotique, ou bien (iv) à une combinaison de deux ou des trois des expositions précitées.

Ces résultats ont permis aux inventeurs de mettre au point un dispositif, avantageusement un dispositif comprenant des moyens pour la détermination, 5 avantageusement *in vitro*, du niveau ou profil d'expression d'une combinaison déterminée de gènes cibles (avantageusement par analyse transcriptomique ciblée ou par analyse protéomique ciblée), dans un échantillon provenant d'une plante, y compris un échantillon provenant d'une partie de plante, y compris d'une plante de la famille des *Rosaceae*.

Les inventeurs ont montré que la détermination *in vitro* du niveau ou profil d'expression 10 de cette combinaison déterminée de gènes cibles permet l'étude et/ou la détermination de l'état de stimulation des défenses naturelles de la plante dont provient ledit échantillon.

La présente invention a ainsi pour objet un nouveau dispositif ou un nouvel outil de recherche, avantageusement un dispositif de biologie moléculaire, pour la caractérisation d'un échantillon biologique, par détermination du niveau d'expression d'une combinaison spécifique 15 de gènes cibles.

Plus précisément, la présente invention concerne un dispositif pour déterminer et/ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes, lequel dispositif comprend des moyens pour déterminer le niveau ou profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon de plante ou de partie de plante, lesdits moyens de détermination 20 comprenant :

- (a) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15 ;
- (b) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : PAL, CHS, DFR, ANS, PPO ;
- 25 (c) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : HMGR, FPPS, Far ;
- (d) un moyen de détermination du niveau d'expression du gène cible CSL ;
- (e) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes suivants : APOX, GST, POX ;
- 30 (f) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : CalS, Pect, CAD ;
- (g) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : EDS1, WRKY ;
- (h) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi 35 les gènes cibles suivants : LOX2, JAR ;
- (i) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : ACCO, EIN3.

Malgré le nombre limité et déterminé de gènes cibles analysés, les inventeurs ont montré que le dispositif selon l'invention constitue un outil particulièrement polyvalent et

puissant, autorisant l'étude et/ou la détermination de l'état de stimulation des défenses naturelles des plantes (i) exposées à un ou plusieurs composés ou à une ou plusieurs compositions stimulateurs de défenses naturelles et/ou (ii) exposées à une grande variété de stress, ce qui englobe aussi bien des stress biotiques que des stress abiotiques, et/ou (iii) exposées à une combinaison des expositions précitées (i) et (ii).

Le dispositif selon l'invention présente l'intérêt d'apporter des résultats simples, rapides et efficacement interprétables, sur l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante.

Le dispositif selon l'invention permet notamment d'étudier et/ou d'identifier des composés candidats, susceptibles de consister en des stimulateurs des défenses naturelles des plantes et capable d'induire un mécanisme de réaction des plantes à l'encontre d'une agression par des organismes nuisibles et/ou un mécanisme de réaction de défense à l'encontre des stress abiotiques naturels.

Selon un mode de réalisation préféré, le dispositif selon l'invention comprend les moyens de détermination du niveau d'expression des gènes suivants :

(i) pour le groupe (a), un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : PR-1, PR-2, PR-4 ou PR-8, un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PR-5, un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PR-14 et un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PR-15, et/ou

(ii) pour le groupe (b), un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PAL, un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : CHS, DFR ou ANS, et un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PPO, et/ou

(iii) pour le groupe (c), un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : HMGR et Far, et un moyen de détermination du niveau d'expression du gène FPPS, et/ou

(iv) pour le groupe (e), un moyen de détermination du niveau d'expression du gène APOX et un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : GST et POX.

Selon un mode de réalisation encore préféré, ce dispositif comprend les moyens de détermination du niveau d'expression de la combinaison des gènes cibles suivants : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO, EIN3.

Les moyen de détermination du niveau d'expression d'un gène cible sont avantageusement choisis parmi (i) les fragments d'acide nucléique capables de s'hybrider de manière spécifique aux ARNm exprimés par ledit gène cible ou aux ADNc correspondants, ou à des fragments desdits ARNm ou desdits ADNc, et/ou (ii) les anticorps se liant spécifiquement aux produits d'expression dudit gène cible, desdits ARNm ou desdits ADNc, ou fragments desdits produits d'expression.

Dans les modes de réalisation (i) ci-dessus, les fragments d'acide nucléique précités consistent avantageusement en des amorces nucléotidiques s'hybridant spécifiquement avec

les ARNm, les ADNc, ou des fragments de ceux-ci, dérivés de chacun des gènes cibles d'intérêt.

Dans certains modes de réalisation, les amorces nucléotidiques correspondantes sont avantageusement adaptées à la détermination du niveau d'expression des gènes cibles par une méthode de PCR quantitative.

Les amorces nucléotidiques sont avantageusement choisies parmi les séquences suivantes SEQ ID n°32 à 87. L'utilisation de ces amorces, dans la disposition selon l'invention, est illustrée dans les exemples.

Selon un mode particulier de réalisation, les fragments d'acide nucléique ou lesdits anticorps sont immobilisés sur un support.

Dans les modes de réalisation du dispositif dans lesquels les moyens de détermination du niveau d'expression d'un gène cible consistent en des acides nucléiques, ledit dispositif consiste ainsi avantageusement en une puce à ADN, pouvant être désignée encore sous la dénomination de « puce à faible densité quantitative » ou « qPFD » (du fait du nombre limité de gènes ciblés).

Dans les modes de réalisation (ii) ci-dessus, les anticorps sont choisis parmi les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux, y compris les anticorps monoclonaux recombinants.

La présente invention concerne également sur des procédés mettant en œuvre le dispositif selon l'invention et qui seront présentés en détails dans la description, à savoir :

- un procédé pour identifier un profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles (encore désigné « signature » ou « signature d'expression ») permettant de déterminer, ou au moins d'évaluer, un état de stimulation des défenses naturelles de plantes ;
- un procédé pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou d'une partie de telles plantes ;
- un procédé pour sélectionner une substance ayant la propriété de moduler l'état de stimulation des défenses naturelles d'un plant ou d'une partie de plant ;
- un procédé pour sélectionner une plante ou partie de plante, présentant un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de leur conférer une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt.

Chacun de ces dispositifs est tout particulièrement adapté pour une mise en œuvre sur des plantes ou parties de plantes appartenant à la famille des *Rosaceae*.

Tel que divulgué ci-après, la présente invention fournit donc un nouveau dispositif ou outil pour déterminer et/ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes, qui utilise pour cela la détermination du profil d'expression et/ou la détection du profil d'expression et/ou la quantification du niveau d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon de plante ou de partie de plante.

Les inventeurs ont ainsi identifié un ensemble de gènes cibles contenus dans le génome de plante qui constituent des marqueurs biologiques aptes à servir d'indicateurs dans l'étude

et/ou la détermination de la présence et/ou du niveau et/ou de l'intensité de l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie de plante.

Les inventeurs ont montré que le dispositif selon l'invention permet, avec un nombre limité et déterminé de marqueurs, de déterminer et/ou d'étudier l'effet d'un composé ou d'une composition d'intérêt et/ou d'un stress biotique et/ou d'un stress abiotique, sur l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou parties de plantes traitées.

Il s'avère que ce dispositif selon l'invention est en particulier intéressant pour l'étude des plantes ou des parties de plantes du genre des *Rosaceae* ou Rosacées, comme cela est illustré dans les exemples.

Après avoir défini certains termes, la présente divulgue les gènes cibles spécifiquement sélectionnés pour l'étude et/ou la détermination de l'état de stimulation des défenses naturelles des plantes ou parties de plantes, puis décrit le dispositif selon l'invention avec les moyens pour mesurer et/ou déterminer le niveau ou profil d'expression desdits gènes cibles respectifs.

Un tel dispositif présente de nombreuses applications qui seront également développées ci-après, notamment (i) la sélection et l'étude de composés ou de compositions qui sont aptes à modifier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou de parties de plantes et/ou (ii) la sélection de plantes ou de parties de plantes présentant ou étant aptes à présenter un état particulier de stimulation des défenses naturelles, par exemple suite à l'application d'un composé ou d'une composition d'intérêt et/ou d'un stress biotique et/ou d'un stress abiotique.

Définition

Par « plante », on entend tout organisme pluricellulaire appartenant au sous-règne des *Tracheobionta*, comprenant les ptéridophytes et les spermaphytes. Par « spermaphytes », on entend un organisme appartenant aux gymnospermes ou de préférence encore aux angiospermes. Parmi les angiospermes, on entend les monocotylédones ou encore les dicotylédones, et de préférence encore les eudicotylédones. Par « dicotylédones », on entend les sous-classes suivantes : *Asteridae*, *Caryophyllidae*, *Dilleniidae*, *Hamamelidae*, *Hamamelididae*, *Magnoliidae* ou *Rosidae*. Par « *Rosidae* », on entend les ordres suivants : *Apiales*, *Celastrales*, *Cornales*, *Euphorbiales*, *Fabales*, *Geraniales*, *Haloragales*, *Linales*, *Myrtales*, *Podostemales*, *Polygalales*, *Proteales*, *Rafflesiales*, *Rhamnales*, *Rhizophorales*, *Rosales*, *Santalales*, *Sapindales*. Dans l'ordre des *Rosidae*, on choisit encore de préférence une plante de la famille des *Rosaceae*, y compris les pommiers.

Par « échantillon », on entend un échantillon biologique contenant le matériel biologique permettant de détecter l'expression de la combinaison de gènes cibles.

Le matériel biologique peut comprendre notamment des protéines et/ou des acides nucléiques tels que notamment les acides désoxyribonucléiques (ADN) ou les acides ribonucléiques (ARN). Ce matériel biologique comprend du matériel spécifique des gènes cibles, tel que notamment les ARNm transcrits par les gènes cibles ou les protéines issues de ces ARNm, mais peut comprendre également du matériel non spécifique des gènes cibles, tels

que notamment les ARNm transcrits par les gènes autres que les gènes cibles ou les protéines issues de ces ARNm. Selon un mode de réalisation de l'invention, le matériel biologique comprend des ARN, et encore plus préférentiellement des ARN totaux ; les ARN totaux comprennent les ARN de transfert, les ARN messagers (ARNm), tels que les ARNm transcrits par les gènes cibles mais également transcrits par tout autre gène, et les ARN ribosomiaux.

Les échantillons biologiques englobent des fragments de tissus prélevés sur la plante, ainsi que les produits résultant de l'extraction ou la purification des acides nucléiques (ADN, ARNm) ou des protéines contenus dans lesdits fragments de tissus, ainsi que certains produits de transformation des substances contenues dans lesdits fragments de tissu ou dans lesdits produits de transformation, par exemple les acides nucléiques du type ADNc obtenus par transcription inverse des acides nucléiques du type ARNm.

Par « partie de plante », on entend le fragment d'une plante contenant au moins une cellule de plante, par exemple un organe de plante (tel qu'une feuille, un bourgeon, une fleur, une racine, un fruit, une graine ou partie de ceux-ci) ou un tissu de plante (tel qu'un méristème).

Par « stress environnementaux », on désigne l'ensemble des facteurs extérieurs à une plante susceptible d'affecter le métabolisme normal de cette plante et d'induire chez elle une réaction d'adaptation et/ou de défense. Les stress environnementaux peuvent provenir d'être vivants (il s'agit de stress biotique), ou de facteurs autres (on parle alors de stress abiotique).

Les stress biotiques regroupent notamment l'ensemble des agents pathogènes microbiens, tels que les agents pathogènes fongiques, bactériens, viraux ou ravageurs, et les infections ou infestations dont ils sont responsables.

Les stress abiotiques regroupent l'ensemble des stress de nature physique ou chimique, et notamment les stress oxydatifs ou climatiques ; il s'agit notamment des stress hydriques, comme le manque d'eau, ou les stress thermiques comme le froid ou la chaleur. Les stress oxydatifs regroupent l'ensemble des stress aboutissant à l'augmentation de la concentration d'agents oxydants dans une plante ou une partie de plante.

Par « état de stimulation de défenses naturelles », on entend le développement d'un ensemble de modifications biologiques qui confèrent à cette plante (i) une résistance immédiate, notamment LAR ou SAR, et/ou (ii) une pré-sensibilisation du type potentialisation grâce à laquelle elle devient capable de réagir plus efficacement à un stress ultérieur, biotique ou abiotique.

L'« état de stimulation de défenses naturelles » se réfère également au statut, activé ou non-activé, des différentes voies moléculaires impliqués dans les mécanismes de défenses naturelles.

Par « état de stimulation de défenses naturelles », on entend encore la résistance au stress, c'est-à-dire différents niveaux de tolérance au stress, à savoir une faculté des plantes à faire face aux stress biotiques et/ou de stress abiotiques. La résistance au stress peut être classée selon différents niveaux : - sensibilité, - tolérance moyenne à un ou plusieurs

agressions biotiques ou abiotiques, et - tolérance élevée ou résistance totale à une ou plusieurs agressions biotiques ou abiotiques.

Par « état de stimulation de défenses naturelles », on entend en particulier la capacité d'une plante à résister aux maladies, c'est-à-dire différents niveaux de résistance et/ou de tolérance d'une plante aux maladies, y compris la sensibilité, la résistance moyenne et la résistance élevée ou une résistance totale à un ou plusieurs agents pathogènes. Elle peut correspondre à une modification des symptômes induits par des agents pathogènes de la maladie (tels que la fréquence et/ou la taille des lésions, etc.), ainsi que l'étendue de la colonisation des tissus par l'agent pathogène ou le pourcentage d'infection, par rapport à ceux observés dans les plantes témoins sensibles et cultivées avec des maladies identiques. La résistance à la maladie peut également être illustrée par une croissance plus élevée et/ou un rendement des plantes résistantes en comparaison des plantes sensibles lorsqu'elles sont cultivées sous la pression de la maladie.

Les expressions « état de stimulation des défenses naturelles activé », « état de stimulation des défenses naturelles induit », « amélioration de la résistance au stress », « résistance accrue à la maladie » et « réaction de défense renforcée » se réfèrent en particulier à toute augmentation significative de la résistance au stress ou de la résistance aux maladies d'une plante ou de tissus végétaux, par rapport à un contrôle approprié tel qu'une plante non soumise à un produit SDN ou ce même stress ou cette même maladie.

Par « état de stimulation des défenses naturelles activé », « état de stimulation des défenses naturelles induit », on se réfère encore à toute activation/induction des voies moléculaires impliqués dans les mécanismes de défenses naturelles dans une plante ou partie de plante soumise à un produit SDN ou un stress, par rapport à un contrôle approprié tel qu'une plante non soumise à ce même produit SDN ou ce même stress.

Par exemple, par « état de stimulation de défenses naturelles », on entend notamment un état « résistant » ou « sensible » à *E. amylovora* responsable du feu bactérien

Par « détermination et/ou étude de l'état de stimulation des défenses naturelles », on entend aussi bien (i) la détermination et/ou l'étude de l'existence ou de l'absence d'une telle stimulation des défenses naturelles, que (ii) la détermination et/ou l'étude du niveau et/ou de l'intensité de cette stimulation des défenses naturelles.

Par « niveau d'expression d'une combinaison de gènes cibles » ou « profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles », on entend tout paramètre ou marqueur biologique détectable, mesurable et/ou quantifiable, dans la plante ou partie de plante étudiée, qui correspond, directement ou indirectement, au niveau d'expression de chacun des gènes sélectionnés.

Les termes « niveau d'expression » incluent l'absence et/ou la présence et/ou une valeur représentative de la quantité d'ARN messagers (« ARNm » ou « mRNA ») transcrits à partir de l'ADN génomique correspondant aux gènes cibles sélectionnés.

L'expression « niveau d'expression » inclut encore l'absence et/ou la présence et/ou la valeur représentative de la quantité de protéines codées par les gènes cibles sélectionnés.

Par « surexpression » ou « activation » d'un gène, on entend un niveau quantitatif d'expression du marqueur dudit gène qui est multiplié au moins par 3 par rapport à un niveau quantitatif de la référence, de préférence encore au moins 4x, 5x, 10x, 20x, 30x ou plus.

Par « sous-expression » ou « inactivation » ou « répression » d'un gène, on entend un niveau quantitatif d'expression du marqueur dudit gène qui est divisé au moins par 3 par rapport à un niveau quantitatif de la référence, de préférence au moins 4x, 5x, 10x, 20x, 30x ou plus, voire non détectable.

Un niveau d'expression « constant » d'un gène correspond à un niveau quantitatif d'expression du marqueur dudit gène qui est compris dans un domaine délimité par une division par 3 et une multiplication par 3 dudit niveau quantitatif, par rapport au niveau quantitatif de la référence.

Le niveau d'expression des marqueurs peut être « relatif », c'est-à-dire que la variation de niveau d'expression d'un ou de plusieurs gènes est comparée par rapport au niveau d'expression d'autres échantillons, après « normalisation » des niveaux d'expression en utilisant par exemple des gènes contrôle.

Le multiple de modulation d'expression de chacun des gènes cibles, en surexpression ou en sous expression, peut être mesurée en utilisant par exemple des moyens de détermination du type PCR quantitative, avantageusement en temps réel, comme illustré par les exemples.

Les résultats peuvent être obtenus selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$ (Delta Delta CT) qui fournit les expressions relatives des gènes de défense dans un échantillon donné par rapport à l'échantillon appelé « calibrateur » (par exemple un échantillon d'une plante ou partie de plante non traitée, ou encore par exemple un échantillon d'une plante ou partie de plante traitée), expressions normalisées par la moyenne géométrique des gènes de référence de ces échantillons (Vandesompele et al., Genome Biol. 3(7) : research0034.1-0034.11, 2002 ; Livak et Schmittgen, Methods 25:402-408, 2001).

Le niveau d'expression des marqueurs peut également être « absolu », c'est-à-dire que les niveaux d'expression des marqueurs se réfèrent à la quantité absolue desdits marqueurs (ARNm ou protéines) dans un échantillon.

Selon l'invention, un « profil d'expression » ou une « signature d'expression » consiste en une représentation de l'ensemble des valeurs de niveaux d'expression de chacun des gènes cibles testés, pour la combinaison de gènes cibles testée.

Combinaison de gènes cibles utilisés dans le dispositif selon l'invention

Le dispositif selon l'invention comprend des moyens pour déterminer et/ou étudier le niveau d'expression d'une combinaison établie de gènes cibles, ou autrement dit d' « un ensemble de gènes cibles ».

Cette combinaison selon l'invention se compose des neuf groupes de gènes cibles (a) à (i) suivants :

(a) au moins un gène cible choisi parmi les gènes codant des PR-protéines : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15 ;

5 (b) au moins un gène cible choisi parmi les gènes codant des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes : PAL, CHS, DFR, ANS, PPO ;

(c) au moins un gène cible choisi parmi les gènes codant des enzymes de la voie des isoprénoïdes : HMGR, FPPS, Far ;

(d) un gène cible CSL, codant pour une enzyme du catabolisme de la cystéine ;

10 (e) au moins un gène cible choisi parmi les gènes codant pour des enzymes antioxydantes : APOX, GST, POX ;

(f) au moins un gène cible choisi parmi les gènes codant des enzymes impliquées dans les modifications de paroi : CalS, Pect, CAD ;

15 (g) au moins un gène cible choisi parmi les gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'acide salicylique : EDS1, WRKY ;

(h) au moins un gène cible choisi parmi les gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'acide jasmonique : LOX2, JAR ;

(i) au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles impliqués dans la voie de signalisation de l'éthylène : ACCO, EIN3.

20 En pratique, la surexpression dans un échantillon testé d'au moins l'un des gènes cibles, et de préférence encore d'une combinaison desdits gènes cibles dans au moins deux desdits groupes (a) à (i), par rapport à un échantillon non traité, permet d'identifier les plantes ou parties de plantes présentant un état de stimulation des défenses naturelles activé ou induit.

Ces gènes cibles sélectionnés sont présentés plus en détails dans le tableau 1 ci-après.

25

Tableau 1 : liste des gènes cibles selon l'invention

SEQ ID N°	Nom du gène	Unigène Pommier (NCBI)	Fonction du gène	N°Accession Pommier ADNc (NCBI)
1	PR-1	Mdo.3966	Pathogenesis-related protein 1 PR-protéine	AF507974
2	PR-2	Mdo.2984	Pathogenesis-related protein 2 (glucanases) PR-protéine	AF494404
3	PR-4	Mdo.2382	Pathogenesis-related protein 4 (hevein-like) PR-protéine	CN877594
4	PR-5	Mdo.999	Pathogenesis-related protein 5 (thaumatin-like, osmotin) PR-protéine	DR998561
5	PR-8	Mdo.3935	Pathogenesis-related protein 8 (class III chitinase)	DQ318214

SEQ ID N°	Nom du gène	Unigène Pommier (NCBI)	Fonction du gène	N°Accession Pommier ADNc (NCBI)
			PR-protéine	
6	PR-14	Mdo.12217	Pathogenesis-related protein 14 (lipid transfer protein)	CV656658
			PR-protéine	
7	PR-15	-	Pathogenesis-related protein 15 (oxalate oxidase)	GO500607
			PR-protéine	
8	PAL	Mdo.2983	Phenylalanine ammonia-lyase	AF494403
			Voie des phénylpropanoïdes	
9	CHS	Mdo.6113	Chalcone synthase	AF494401
			Voie des phénylpropanoïdes	
10	DFR	Mdo.13736	Dihydroflavonol reductase	AF494390
			Voie des phénylpropanoïdes	
11	ANS	Mdo.2932	Anthocyanidin synthase	DQ156905
			Voie des phénylpropanoïdes	
12	PPO	Mdo.2905	Polyphenol oxidase	L29450
			Voie des phénylpropanoïdes	
13	HMGR	Mdo.2960	Hydroxymethyl glutarate-CoA reductase	AY043490
			Voie des isoprénoïdes	
14	FPPS	Mdo.2964	Farnesyl pyrophosphate synthase	AY083165
			Voie des isoprénoïdes	
15	Far	Mdo.3011	(E,E)-alpha-farnesene synthase	EB111255
			Voie des isoprénoïdes	
16	CSL	Mdo.12560	C-S-lyase	AY347795
			Catabolisme de la cystéine	
17	APOX	Mdo.1891	Ascorbate peroxidase	CN928974
			Système antioxydant	
18	GST	Mdo.12372	Glutathion S-transférase	FE969955
			Système antioxydant	
19	POX	Mdo.11566	Peroxydase	CN913385
			Système antioxydant	
20	CalS	Mdo.12945	Callose synthase	CN496203
			Modification pariétale	
21	Pect	Mdo.15511	Pectin methyl esterase	CV628630
			Modification pariétale	
22	CAD	Mdo.2625	Cinnamyl alcool dehydrogenase	AF053084
			Modification pariétale	
23	EDS1	Mdo.1759	Disease resistance protein EDS1	CN949066
			Signalisation acide salicylique	
24	WRKY	-	WRKY transcription factor 30	AY347836
			Signalisation acide salicylique	
25	LOX2	Mdo.10456	Lipoxygénase AtLOX2	CN941066
			Signalisation acide jasmonique	
26	JAR	Mdo.2326	Jasmonate resistant 1	CN879199
			Signalisation acide jasmonique	
27	ACCO	Mdo.3241	1-aminocyclopropène-1-carboxylate oxidase	AB086888
			Signalisation éthylène	

SEQ ID N°	Nom du gène	Unigène Pommier (NCBI)	Fonction du gène	N°Accession Pommier ADNc (NCBI)
28	EIN3	Mdo.12601	EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 1	CV082047
			Signalisation éthylène	
29	TuA	Mdo.3499	Tubulin alpha-1 chain	CO065788
			Gène de référence	
30	Actin	Mdo.701	Actin 7	CV151413
			Gène de référence	
31	GAPDH	Mdo.1683	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CN494000
			Gène de référence	

Parmi ces gènes, on peut distinguer des gènes dont la fonction est connue mais qui n'ont jamais été mis en relation avec les mécanismes de défenses naturelles chez les Rosacées, par exemple le gène CSL.

5 Les gènes TuA, Actin et GAPDH constituent des gènes marqueurs dont le niveau d'expression est indépendant de l'état de stimulation des défenses naturelles. Ces gènes sont ici cités uniquement à titre d'exemple. De tels gènes « rapporteurs » permettent de corriger le niveau d'expression déterminé pour chacun des gènes cibles.

10 Dans la présente description, les appellations employées pour désigner chacun des gènes cibles correspondent à une appellation internationale reconnue, qui se retrouvent notamment dans les bases de données de séquences de gènes et de séquences de protéines, par exemple les bases UniGene proposées par le National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA). Pour cela, on se réfère de préférence à la base de données UniGene *Malus domestica*

15 Les gènes cibles en question sont encore définis respectivement par les séquences éditables à partir des numéros d'accèsion Unigene spécifiés dans le tableau 1.

Les gènes cibles selon l'invention désignent également les « variants » ou « unigènes » ou allèles qui correspondent à ces séquences.

20 Ces variants possèdent au moins 70%, 80%, 90%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou plus, d'identité en nucléotides avec les séquences précitées, préférentiellement par alignement de séquences sur toute leur longueur et comparaison de l'identité des bases après alignement.

25 De tels variants peuvent être identifiés par différentes méthodes de la technique, telles que des techniques d'hybridation d'acides nucléiques (par exemple Southern blot, Northern blot, etc.), des méthodes basées sur les protéines (par exemple Western blot), des méthodes basées sur les techniques PCR, de séquençage, d'analyse bioinformatique (en utilisant par exemple un programme informatique du type FASTA ou BLAST, en utilisant les paramètres par défaut).

30 Les variants sont de préférence des variants fonctionnels, c'est-à-dire qu'ils codent pour des protéines ayant les mêmes fonctions biologiques, ou au moins des fonctions biologiques similaires, par rapport aux protéines issues des séquences précitées.

Les variants incluent également les séquences, ou gènes, homologues ou orthologues rencontrés de préférence dans les genres ou les variétés de Rosacées autres que *Malus domestica*.

5 Plus généralement, les variants incluent avantageusement également les séquences, ou gènes, homologues ou orthologues qui se rencontrent dans toute autre plante, de préférence dans tout organisme appartenant au sous-règne des *Tracheobionta*, de préférence encore appartenant aux spermaphytes, de préférence encore aux angiospermes, de préférence encore aux dicotylédones, et de préférence encore au *Rosidea*.

10 Le terme « orthologue » ou « homologue » pour une séquence, un gène ou une protéine, se réfère ici à la séquence, au gène ou à la protéine, homologue qui se trouve dans une autre espèce, présentant la même fonction que la séquence, le gène ou la protéine d'intérêt, mais (généralement) qui a divergé(e) en séquence à partir du moment où les espèces comportant lesdits gènes ont divergées (les gènes ont évolué à partir d'un ancêtre commun par spéciation). De tels séquences ou gènes orthologues peuvent ainsi être identifiés dans d'autres
15 espèces végétales par technique de comparaison de séquences (par exemple basés sur des pourcentages d'identité de séquences sur la séquence entière ou sur des domaines spécifiques) et / ou d'analyse fonctionnelle.

De telles séquences orthologues ont par exemple été identifiées chez d'autres genres de la famille des Rosacées.

20 Le tableau 2A ci-après précise le numéro d'accèsion dans la base de données GenBank proposée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), de chacune des séquences orthologues identifiées.

Tableau 2A : Séquences orthologues pour les gènes cibles selon l'invention

N°	Nom du gène	Orthologue chez les <i>Fragaria</i>	Orthologue chez les <i>Prunus</i>	Orthologue chez les <i>Pyrus</i>	Orthologue chez les <i>Rosa</i>
1	PR-1	DV440399	DN556381 GE653251	AF195235	EC586767
2	PR-2	EX682264	DN554095	AJ504892	EC587362
3	PR-4	EX657003	CB823353	-	-
4	PR-5	DY668082 EX674853	GE653177	FK939207	BI977710
5	PR-8	DY672350	CV051978 CV052812	AJ504863	BI977412
6	PR-14	DY673738	AM290861	AF195216	EC589716
7	PR-15	DY673400	GR410635	-	EC586210
8	PAL	CO817421 EX684393	CV046544	-	-
9	CHS	AI795154 DY667960	CB820023 FE969272	FK939234	CF349759
10	DFR	DY672493 EX661062	CV046853 CB819555	DB999982	-
11	ANS	CX661854	BU039495	FK939239	BI977949
12	PPO	DY667415	CV045870	AJ504916	-

N°	Nom du gène	Orthologue chez les <i>Fragaria</i>	Orthologue chez les <i>Prunus</i>	Orthologue chez les <i>Pyrus</i>	Orthologue chez les <i>Rosa</i>
		EX674603			
13	HMGR	DY669718 EX659154	AM290185 FC861452	-	BQ106200
14	FPPS	DY669331 EX660570	DY644308	-	BQ104581
15	Far	DY675841	DY646265	-	CF349900
16	CSL	CO817796	AJ533335 BU047350	-	-
17	APOX	CX661243 CX661894	CV045878 GE653243	GR957944	EC586214 BI978785
18	GST	DV438230 DV438954	CB820780	DB999954	EC587514
19	POX	DY676157 DY670759	DW341091 GR410510	DC993457	EC586635
20	CaIS	EX687641	DY633833	DC993380	BQ104579
21	Pect	DY666714	BU044880	-	BQ104257
22	CAD	CX662236	EE488909	DV440820	CF349542
23	EDS1	DY673255	DY652698 FC866180	-	CF349463
24	WRKY	EX687984	AJ873733	-	-
25	LOX2	DY674691	BU046906	-	CF349741
26	JAR	DY667416	FC864077	-	-
27	ACCO	CX662198 EX670124	AJ833064	DB999960	EC588379
28	EIN3	DY666956	EE488205	-	-
29	TuA	DY671340 DY674254	BU042671	-	BQ106089 BQ105408
30	Actin	DY668010 EX688327	DY650839 CV044868	-	BQ104395 BI977396
31	GAPDH	DY667270 DY667095	DW357797 DW350728	-	BI978153 BQ104075

De la même manière, le dispositif selon l'invention pourrait être utilisé pour l'étude de plantes de la famille des *Vitaceae* (vigne), notamment des espèces du genre *Vitis*, et en particulier *Vitis vinifera*.

5 A titre indicatif, des séquences orthologues, correspondant aux gènes cibles, ont par exemple été identifiées chez *Vitis vinifera*.

10 Le tableau 2B ci-après précise le numéro d'accèsion dans la base de données GenBank proposée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) ou dans la base de données proposée par le Génoscope (Evry, France), de chacune des séquences orthologues identifiées.

Tableau 2B

Nom du gène	Orthologue chez <i>Vitis vinifera</i> (Vigne)	
	n°accession EST (NCBI)	n°accession gène (genoscope)
PR-1	EE253686.1	GSVIVT01037005001
PR-2	GO652966.1	GSVIVT01033538001
PR-4	FG984977.1	GSVIVT01036279001
PR-5	EC925003.1	GSVIVT01019840001
PR-8	EC965083.1	GIDVvT00013094001
PR-14	DT021081.1	GIDVvT00010281001
PR-15	EC968706.1	GSVIVT01031082001
PAL	CN006882.1	GSVIVT01025703001
ANS	CF209704.1	GSVIVT01019892001
CHS	EV241635.1	GSVIVT01032968001
DFR	EE082741.1	GSVIVT01009743001
PPO	CF215866.1	GIDVvT00029382001
HMGR	EC937417.1	GSVIVT01013435001
FPPS	EC962139.1	GSVIVT01014738001
Far	DT009302.1	GSVIVT01000402001
Alli	FC061753.1	GSVIVT01001413001
APOX	CF211522.1	GSVIVT01015626001
GST	EE099033.1	GSVIVT01027961001
POX	DT007525.1	GSVIVT01009107001
CAD	CF511159.1	GSVIVT01025239001
CaIS	EE095949.1	GSVIVT01025362001
Pect	EE076956.1	GSVIVT01011699001
EDS1		GSVIVT01007860001
WRKY		GSVIVT01028718001
LOX2	EE107237.1	GSVIVT01025339001
JAR	EC983478.1	GSVIVT01027057001
ACCO	CF511696.1	GSVIVT01006065001
EIN3	CF214803.1	GSVIVT01015548001

Les gènes cibles selon l'invention sont également définis par les séquences SEQ ID n°1 à 28 qui correspondent à leurs ADNc respectifs, ou par les variants desdites séquences selon la définition ci-dessus.

Les séquences correspondantes sont également consultables sur la base de données GenBank (NCBI), au moyen des numéros d'accès précisés dans le tableau 1.

Pour la notion de « variant », on peut se référer aux définitions développées ci-dessus.

Les gènes cibles selon l'invention sont encore désignés par les protéines qu'ils codent respectivement.

Les séquences peptidiques correspondants aux gènes cibles sont précisées par exemple sur la base de données UniGene *Malus domestica*, et peuvent être obtenues au moyen des numéros d'accès précisés dans le tableau 1.

Selon un mode de réalisation préféré, le dispositif selon l'invention comporte des moyens pour déterminer et/ou étudier le niveau d'expression d'au moins deux gènes dans chacun des groupes (a), (b), (c), (e), (f), (g), (h) et (i) précités.

Ce mode de réalisation préféré offre notamment les avantages suivants :

- 5 - si les gènes cibles d'un même groupe sont co-régulés (c'est surtout le cas des gènes des voies de signalisation qui sont souvent activés de manière transitoire), ils peuvent avoir une expression séquentielle, et le fait d'en choisir un seul augmente le risque de conclure à une absence de modulation de cette voie (si les prélèvements ne sont pas effectués au bon moment pour un gène donné) ;
- 10 - si les gènes cibles d'un même groupe sont non co-régulés (c'est particulièrement le cas des protéines PR, ainsi que des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes, pour le gène PPO d'une part, PAL d'autre part, et enfin le groupe CHS, DFR et ANS), il devient alors arbitraire de n'en choisir qu'un ;
- il permet de suivre les expressions de plusieurs gènes cibles dans chaque groupe, la redondance d'information sur le niveau d'expression de plus d'un gène cible appartenant à un groupe donné accroissant encore la fiabilité des résultats.

Plus précisément, parmi les gènes cibles ci-dessus, le dispositif selon l'invention permet avantageusement l'étude et/ou l'analyse de l'expression de l'une au moins des combinaisons suivantes de gènes :

- 20 - pour le groupe (a), l'un au moins des gènes suivants : PR-1, PR-2, PR-4 ou PR-8, combiné avec l'un au moins des gènes suivants PR-5, PR-14 ou PR-15 ;
- pour le groupe (b), le gène PAL, et l'un au moins des gènes suivants : CHS, DFR ou ANS, et le gène PPO,
- pour le groupe (c), l'un au moins des gènes suivants : HMGR et/ou Far, et le gène FPPS,
- 25 - pour le groupe (e), le gène APOX et l'un au moins des gènes suivants : GST et/ou POX.

Selon un mode de réalisation préféré, la combinaison de gènes cibles étudiée dans le dispositif selon l'invention est la suivante : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO et EIN3.

30

Dispositif selon l'invention, et moyens pour déterminer et/ou étudier le niveau d'expression d'une combinaison de gènes cibles selon l'invention

Caractéristiques générales du dispositif selon l'invention

35

La présente invention englobe le dispositif ou l'outil, avantageusement sous la forme d'une trousse ou d'un « kit », pour déterminer et/ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles dans un échantillon de plantes ou de parties de plantes, en particulier de plants de *Rosaceae* et en particulier encore de plants de pommier.

De tels dispositifs de détection et de quantification s'appuient sur la préparation d'un mélange réactionnel destiné à contenir les marqueurs biologiques d'intérêt et les réactifs spécifiques appropriées, cela dans des conditions adaptées et pendant un temps suffisant pour permettre au marqueur et son réactif spécifique d'interagir et de se lier, et ainsi former un complexe qui peut être retiré et/ou détecté dans ledit mélange réactionnel.

Le dispositif selon l'invention contient pour cela des moyens adaptés pour détecter tout marqueur biologique détectable, mesurable et/ou quantifiable, dans la plante ou partie de plante étudiée, qui correspond, directement ou indirectement, au niveau d'expression de chacun des gènes sélectionnés.

Selon un mode de réalisation préféré, les acides nucléiques (par exemple ARNm ou ADNc) ou les polypeptides constituent les marqueurs d'expression de chacun des gènes cibles d'intérêt.

La méthode de détection du dispositif conforme à l'invention est alors basée avantageusement sur la détection d'ARNm, d'ADNc et/ou de protéines marqueurs, dans l'échantillon.

Les moyens de détection comprennent ainsi avantageusement des réactifs ou ligands ou agents ou composés ou compositions comprenant, ou consistant en, un ensemble de réactifs spécifiques, chacun d'eux étant capable de se lier spécifiquement avec un marqueur biologique d'intérêt, avantageusement du type acide nucléique ou du genre protéine, qui est représentatif du niveau d'expression de l'un des gènes cibles.

Les réactifs adaptés pour se lier avec des marqueurs du type acide nucléique, en particulier un ARNm ou un ADNc, incluent les acides nucléiques de séquences complémentaires.

Par exemple, des réactifs adaptés pour détecter/quantifier des acides nucléiques marqueurs peuvent inclure (i) des oligonucléotides (marqués ou non marqués) fixés à un support, (ii) des oligonucléotides marqués non fixés avec un support, (iii) une paire d'amorces pour une technique PCR ou similaire.

Des réactifs adaptés pour détecter/quantifier des protéines marqueurs incluent les anticorps, les dérivés d'anticorps, les fragments d'anticorps ou similaires.

La trousse ou le kit selon l'invention contient encore tout composé additionnel approprié, utile pour la mise en œuvre de l'invention.

Par exemple, le dispositif peut contenir des fluides ou milieux pour l'hybridation d'acides nucléiques complémentaires ou pour la fixation d'un anticorps avec une protéine.

De manière générale, les dispositifs en question comprennent par exemple plusieurs réactifs spécifiques qui sont capables de détecter l'expression des gènes cibles selon l'invention, qui peuvent être associés avec des échantillons contrôle, des plaques de microtitration, des tubes Eppendorf, un mode d'emploi, etc.

Les éléments constitutifs du dispositif selon l'invention sont présentés plus en détails ci-après.

Moyens pour déterminer le niveau d'expression des gènes cibles dans le dispositif selon l'invention

Le dispositif selon l'invention comporte donc des moyens pour quantifier et/ou déterminer l'expression des gènes cibles précités.

5 Ainsi, tout moyen pour détecter et/ou quantifier un acide nucléique ou une protéine dans un échantillon biologique peut être ici employé.

En l'occurrence, les moyen de détermination du niveau ou du profil d'expression de chaque gène cible sont choisis avantageusement parmi :

10 (i) les fragments d'acide nucléique, sélectionnés parmi ceux capables de s'hybrider de manière spécifique aux ARNm exprimés par chacun des gènes cibles ou aux ADNc correspondants, ou à des fragments desdits ARNm ou desdits ADNc, et/ou

(ii) les anticorps, sélectionnés parmi ceux aptes à se lier spécifiquement aux produits d'expression de chacun des gènes cibles, desdits ARNm ou desdits ADNc, ou aux fragments desdits produits d'expression, c'est-à-dire en particulier une protéine ou un polypeptide.

15 En pratique, la quantification du niveau d'expression de chaque gène cible comprend les étapes suivantes :

(a) la préparation d'un échantillon d'acides nucléiques (ARNm et/ou ADNc) ou de protéines, à partir d'une plante ou d'une partie de plante, et

20 (b) l'hybridation des ARNm/ADNc et/ou des protéines de l'échantillon préparé, avec des moyens de détermination comprenant un ou plusieurs réactifs de référence (polynucléotides du type sonde(s) ou amorce(s), ou anticorps notamment) contenus dans le dispositif selon l'invention.

L'échantillon d'acides nucléiques et/ou de protéines peut être obtenu à partir d'une partie de la plante (par exemple une feuille, racines, etc.), ou de la plante entière (par exemple 25 semences ou jeunes plants), ou d'une pluralité de plantes ou de parties de plantes, tel qu'un lot de plantes ou de feuilles.

Ainsi, dans un premier temps, des parties de plantes sont prélevées, et éventuellement mises en commun, avant les étapes d'isolation de l'échantillon d'acides nucléiques ou de protéines, ou les étapes de détection.

30 L'échantillon d'acides nucléiques ou de protéines est de préférence extrait des cellules, par exemple en utilisant des méthodes standard d'extraction des acides nucléiques ou de protéines.

Des extraits bruts ou des échantillons de tissus bruts, comme par exemple les tissus végétaux homogénéisés, peuvent aussi être utilisés comme échantillon d'acides nucléiques ou de protéines, dans lequel les marqueurs transcrits ou les marqueurs protéines sont détectés 35 et/ou quantifiés.

A partir de l'échantillon préparé, le dispositif selon l'invention permet de quantifier le niveau d'expression en ARNm (ou des ADNc correspondants) ou en protéines spécifiques, correspondant aux gènes cibles précités.

Selon un mode de réalisation préféré, le dispositif selon l'invention est adapté pour étudier l'expression de gènes cibles sur la base de marqueurs du type nucléiques.

Dans ce cas, le dispositif peut être réalisé sous la forme d'une puce à ADN, désignée encore par les appellations de puce à gènes ou biopuce, ou par les termes « DNA chip », « DNA-microarray » ou « biochip ».

L'échantillon d'acides nucléiques est de préférence un échantillon d'ARNm ou d'ARN total ou d'ADNc.

Les ADNc peuvent être, de manière optionnelle, amplifiés par l'utilisation de toute méthode basée sur les réactions de polymérisation en chaîne, avant hybridation avec le ou les polynucléotides de référence ; de manière alternative, ces ADNc ne sont pas amplifiés.

Pour l'évaluation du niveau de transcription des gènes cibles en question, les moyens de détermination peuvent par exemple être basés sur (i) les méthodes d'amplification du type PCR quantitative, de préférence la méthode de RT-PCR quantitative, ou (ii) les méthodes d'hybridation d'acides nucléiques, par exemple sous forme de puces à ADN ou « hybridation microarray ».

La PCR quantitative (qPCR ou QPCR) peut être réalisées par des techniques et équipements conventionnels, bien connu de l'homme du métier, décrit par exemple dans S.A. Bustin (Ed.), *et al.*, A-Z of Quantitative PCR, IUL Biotechnology series, n°5, 2005.

Une méthode possible est la PCR quantitative avec transcription inverse ou RT-qPCR (voir Czechowski et al., 2004, Plant J. 38, 366-379 ; Czechowski et al. 2005, Plant Physiol. 139, 5-17 ; Vandesompele et al., 2002, Genome Biol. 3(7):research0034.1-0034.11).

Cette technique de mesure permet la détection d'un niveau relatif ou absolu d'expression de l'ARNm des gènes cibles dans l'échantillon.

Un tel dispositif employant une technique de qPCR est décrit plus en détail par la suite, et une application pratique est présentée dans les exemples.

De manière alternative, la détermination est classiquement obtenue par la mise en contact de l'échantillon d'acides nucléiques avec un support sur lequel sont fixés une pluralité de polynucléotides comportant des séquences complémentaires (par exemple au moins 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500 ou plus résidus ou bases nucléotidiques) à la séquence de chacun des acides nucléiques ou polynucléotides marqueurs.

Ces polynucléotides fixés comportent une séquence possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec le marqueur nucléique d'un gène cible.

Selon la présente invention, le marqueur spécifique du gène cible peut être (i) une séquence nucléotidique comprise dans un ARN messager issu du gène cible (on parle alors d'ARNm spécifique du gène cible), (ii) une séquence nucléotidique comprise dans un ADN complémentaire obtenu par transcription inverse dudit ARN messager (on parle alors d'ADNc spécifique du gène cible), ou encore (iii) une séquence nucléotidique comprise dans un ARN

complémentaire obtenu par transcription dudit ADNc tel que décrit précédemment (on parlera alors d'ARNc spécifique du gène cible).

Si les différents polynucléotides marqueurs fixés sont détectables indépendamment sur un même support (par exemple par l'utilisation de différents chromophores ou fluorophores, ou fixés à différentes positions sélectionnées dudit support), les niveaux d'expression d'une pluralité de marqueurs peuvent être étudiés simultanément sur ce support unique.

Des méthodes appropriées pour la détection et la quantification par biopuces à polynucléotides fixés sont décrites dans l'état de la technique et peuvent par exemple être trouvées dans : Applications of DNA Microarrays in Biology. R.B. Stoughton (2005), Annu. Rev. Biochem. 74:53-82, ou dans David Bowtell and Joseph Sambrook, DNA Microarrays : A Molecular Cloning Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003 ISBN 0-870969-625-7.

Pour construire une telle puce à ADN fixé, des molécules d'acide nucléique sont attachées à un support solide à des endroits connus ou « addresses ».

Les molécules d'acide nucléique fixées sont complémentaires aux séquences nucléotidiques selon l'invention, et en particulier aux séquences SEQ ID N°1 à 28, et l'emplacement de chaque acide nucléique sur la puce est connu.

Ces puces avec polynucléotides fixés peuvent, par exemple, être réalisées en utilisant des méthodes (i) de dépôt de sondes pré-synthétisées, (ii) de synthèse in situ ou (iii) de photolithographie.

Les méthodes pour générer des polynucléotidiques marqués et pour l'hybridation à ces puces à ADN sont bien connues dans l'art antérieur (voir par exemple US 2002 / 0144307, et Ausubel *et al.*, Eds. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols (Greene Publishing Associates, Inc, et John Wiley & Sons, Inc, New York, 1994 Supplement)).

Dans le dispositif selon l'invention, l'hybridation entre deux acides nucléiques est avantageusement mise en œuvre dans des conditions d'hybridation stringentes.

Selon un mode de réalisation complémentaire ou alternatif, le dispositif selon l'invention est adapté pour étudier l'expression de gènes cibles sur la base de marqueurs du type protéines.

Dans ce cas, les moyens de détermination peuvent par exemple être basés sur des techniques employant : (i) des anticorps (radio-marqués, marqués avec un chromophore, avec un fluorophore ou une chaîne polymère, ou une enzyme), (ii) des dérivés d'anticorps (par exemple un anticorps conjugué avec un substrat ou avec une protéine ou avec un ligand d'une paire de protéines ligands (par exemple biotine - streptavidine), ou (iii) des fragments d'anticorps (par exemple un anticorps simple chaîne, un domaine d'anticorps isolés, etc.) qui se lient spécifiquement avec une protéine marqueur ou un fragment de celle-ci, ou éventuellement une protéine marqueur qui a subi tout ou partie de ces modifications normales post-traductionnelles.

Le niveau d'expression, obtenu par la mise en œuvre du dispositif selon l'invention, peut être exprimé avec une unité arbitraire qui reflète la quantité d'ARN messenger transcrit pour

chaque gène d'intérêt, tel que l'intensité d'un signal radioactif ou fluorescent émis par le matériel ADNc généré par une analyse PCR du contenu en ARN messager de l'échantillon étudié, incluant des techniques d'analyse PCR en temps réel de l'ARN messager contenu dans l'échantillon.

5 De manière alternative, ce niveau d'expression peut être exprimé en une unité arbitraire qui reflète la quantité de protéines marqueurs qui est détectée dans l'échantillon étudié, tel qu'une intensité d'un signal radioactif ou fluorescent émis par un anticorps marqué spécifique de la protéine d'intérêt.

10 Encore de manière alternative, la valeur obtenue peut consister en une concentration de protéines d'intérêt qui peut être mesurée par diverses méthodes de détection des protéines connues de l'art antérieur, tel que ELISA, MALDI-TOF (pour « Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight »), SALDI-TOF (pour « Surface-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight ») ou Western Blot.

15 Toujours de manière alternative, cette valeur de l'expression des gènes peut être exprimée comme une unité arbitraire relative, corrigée par le niveau d'expression d'un ou plusieurs gènes de référence dits « rapporteurs ») qui ne sont pas modifiés dans l'échantillon par l'état de stimulation des défenses naturelles.

20 Dans ce dernier cas, la valeur de l'expression de chaque gène cible peut être exprimée comme la différence (deltaCT) entre (i) la quantité d'un ARNm ou d'une protéine formant marqueur biologique et (ii) la quantité d'un ARNm ou d'une protéine non marqueur, présent dans l'échantillon choisi par exemple parmi les gènes correspondant à la tubuline, l'actine, la GAPDH ou l'ubiquitine.

25 Pour cela, on peut encore se référer aux documents suivants : Livak et al. (2001, Methods 25:402-408) ou Vandesompele et al. (2002, Genome Biol. 3(7): research0034.1-0034.11).

Deux dispositifs préférés sont détaillés ci-après, sans toutefois constituer une limitation dans les techniques susceptibles d'être employées pour le dispositif selon l'invention.

Quantification biologique de transcrits marqueurs, par amplification d'acides nucléiques

30 Le dispositif selon l'invention comprend avantageusement des moyens pour déterminer le niveau d'expression de la combinaison précitée de gènes cibles, par amplification d'acides nucléiques transcrits (ARNm ou ADNc) dans le cadre d'une technique dite de PCR quantitative.

35 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR ou « Polymerase Chain Reaction ») est une méthode hautement efficace pour une telle quantification d'acides nucléiques constituant marqueurs biologiques.

Pour mettre en œuvre de telles amplifications d'acides nucléiques dans un objectif de quantification des marqueurs biologiques d'intérêt, les moyens de détermination selon l'invention comprennent un ensemble de paires d'amorces, chaque paire d'amorces étant aptes à se fixer et à amplifier spécifiquement avec une cible ARNm ou avec une cible ADNc.

Selon cette technique, les ARN totaux sont extraits et purifiés et les ARN messenger contenus dans l'extrait sont avantageusement convertis dans un premier temps en ADN complémentaires (ADNc), à l'aide d'une transcriptase inverse.

5 Une paire d'amorces apte à s'hybrider spécifiquement avec chacun des acides nucléiques marqueurs peut être dessinée par toute méthode appropriée, connue de la technique.

Les deux amorces sont respectivement choisies sur les brins sens et antisens, de manière à permettre l'amplification d'un fragment d'ADN.

10 Des paires d'amorces dégénérées ou spécifiques pour l'amplification des acides nucléiques SEQ ID n°1 à 28 (ou d'une partie ou d'un variant de ces séquences) peuvent être synthétisées à partir desdites séquences, ou des variants desdites séquences.

15 Avantageusement les amorces sens et anti-sens comprennent au moins 15 nucléotides et présentent une identité d'au moins 80 %, préférentiellement 90 %, et encore préférentiellement 95 %, et encore de préférence 100%, avec la séquence des gènes cibles, ou avec sa séquence complémentaire, ou avec les ADNc précités.

Des exemples de telles amorces spécifiques à chacune des séquences SEQ ID n°1 à 28 sont désignés par les séquences SEQ ID n°32 à 87 (tableau 3 dans la partie Exemple).

De plus, des exemples d'amorces spécifiques des gènes de référence SEQ ID n°29 à 31 sont désignés par les séquences SEQ ID n°88 à 93 (tableau 3).

20 Les moyens de détermination comportent encore des polymérases, préférentiellement la Taq polymérase, mais cela peut être toute autre enzyme présentant une activité polymérase et utilisable dans les conditions opératoires de la PCR.

Au cours de la réaction d'amplification, le produit de la réaction, désigné encore sous l'appellation amplimère ou amplicon, est détecté.

25 La quantité d'ARNm transcrits pour chaque gène cible est mesurée par des moyens autorisant la mise en œuvre de la méthode dite de PCR quantitative ou QPCR.

La PCR quantitative permet la quantification d'une quantité initiale d'ADN, d'ADNc ou d'ARN dans l'échantillon préparé.

30 Elle est pour cela basée sur la détection d'un composé rapporteur fluorescent dont l'intensité de signal augmente lorsque le produit de la PCR s'accumule avec chaque cycle d'amplification.

Les moyens de détermination comportent ainsi des composés rapporteurs fluorescents, c'est-à-dire des composés qui se lient à l'ADN double brin (par exemple dans le cas d'une technique SYBR Green I) ou des sondes spécifiques (par exemple dans le cas d'une technique TaqMan®, d'une technique HybProbes (FRET) ou hybridation de 2 sondes, d'une technique Molecular Beacons ou balises moléculaires, et d'une technique Scorpion ou amorces scorpion).

Pour mettre en œuvre cette technique PCR dans le cadre de la présente invention, on peut se référer aux revues générales sur les techniques PCR et aux instructions des fabricants et distributeurs de réactifs et de thermocycleurs, et en particulier à la notice explicative intitulée

« Quantitation of DNA/RNA Using Real-Time PCR Détection » publiée par Perkin Elmer Applied Biosystems (1999) et au PCR Protocols (Académie Press New-York 1989).

On peut encore employer les informations développées notamment dans les documents suivants : Livak et al. (2001, Methods 25:402–408) et Vandesompele et al. (2002, Genome Biol. 3(7):research0034.1-0034.11).

L'un des avantages de la méthode de détection par QPCR est que l'analyse des produits de PCR se fait directement au cours des cycles de PCR, par la lecture de la fluorescence obtenue au cours des cycles. Il n'est donc pas nécessaire de travailler avec les produits de PCR, qui constitue un risque de contamination pour les analyses ultérieures. Cette détection a lieu avantageusement en pleine phase exponentielle de PCR et non en point final ; ce principe de détection est donc plus sensible et plus spécifique.

En outre la quantification du nombre de cibles initiales dans la réaction est très fiable et reproductible. La détection du produit de PCR se fait au cours des cycles PCR.

Un mode de réalisation particulier pour la quantification de tels marqueurs biologiques, sur la base d'un dispositif mettant en œuvre une technique de quantification par amplification, est divulgué dans les exemples ci-après.

Quantification biologique de protéines marqueurs

Selon un autre mode de mise en œuvre de l'invention, les moyens de détermination des niveaux d'expression des gènes cibles comprennent des moyens de mesure de la quantité de protéines marqueurs, ou de fragments des protéines marqueurs, présente dans l'échantillon préparé.

Pour cela, les moyens de détermination correspondants comprennent avantageusement une combinaison ou un jeu d'anticorps, chaque anticorps étant dirigé spécifiquement à l'encontre d'une protéine ou d'un fragment de protéine, constituant un marqueur représentative de l'expression de l'un des gènes cibles précités selon l'invention.

Les anticorps en question peuvent être polyclonaux, ou de préférence monoclonaux.

On peut employer des anticorps intacts, ou en fragments ou dérivés de tels anticorps (par exemple Fab ou F(ab')₂).

Une variété de technique peut être employée pour déterminer et/ou quantifier un marqueur biologique du type protéine, au moyen d'un anticorps donné.

Par exemple, de tels techniques incluent, mais de manière non limitative, les radioimmuno-essais (« Radioimmunoassay » ou RIA), les essais immunoradiométriques (« Immunoradiometric assay » ou IRMA), les essais enzymoimmunologiques (« Enzymoimmunoassay » ou EIA), les essais immunoenzymatiques (« Enzyme-labeled immunosorbent assay » ou ELISA), les essais immunofluorométriques (« Fluoroimmunoassay » ou FIA, ou « immunofluorometric assay » ou IFMA), les essais immunoluminométriques

(« Luminoimmunoassay » ou LIA, ou « Immunoluminometric assay » ou IFLA), ou les analyses Western blot.

Pour l'obtention des anticorps et la mise en œuvre des techniques ELISA et radioisotopique notamment, on peut se reporter au manuel « Antibodies, A Laboratory Manual »
5 (Cold Spring Harbor Press (1988)).

L'homme du métier peut tout-à-fait adapter les méthodes de détection et/ou de quantification connues protéines/anticorps, pour une utilisation avec le dispositif selon l'invention.

10 **Plante ou partie de plante étudiée au moyen du dispositif selon l'invention**

Le dispositif selon l'invention s'avère en particulier intéressant pour l'étude de plantes, ou de parties de plantes, appartenant à la famille des *Rosaceae* ou Rosacées.

Ce dispositif sera en particulier intéressant pour étudier des plantes, ou parties de plantes, choisies parmi l'une des sous-familles suivantes : les *Amygdaloideae* (famille du pêcher), les *Maloideae* (famille du pommier), les *Rosoideae* (famille du rosier) et les
15 *Spiraeoideae* (famille de la spirée).

Plus précisément encore, le dispositif selon l'invention sera intéressant pour étudier des plantes, ou parties de plantes, choisies parmi l'un des genres suivants : *Acaena*, *Adenostoma*,
20 *Agrimonia*, *Alchemilla*, *Amelanchier*, *Aphanes*, *Aremonia*, *Aria*, *Aruncus*, *Bencomia*,
Brachycaulos, *Cercocarpus*, *Chaenomeles*, *Chamaebatia*, *Chamaebatiaria*, *Chamaemeles*,
Chamaemespilus, *Chamaerhodos*, *Cliffortia*, *Coleogyne*, *Coluria*, *Cormus*, *Cotoneaster*,
Cowania, *Crataegus*, *Cydonia*, *Dalibarda*, *Dichotomanthes*, *Docynia*, *Docyniopsis*, *Dryas*,
Duchesnea, *Eriobotrya*, *Eriolobus*, *Exochorda*, *Fallugia*, *Filipendula*, *Fragaria*, *Geum*, *Gillenia*,
Guamatela, *Hagenia*, *Hesperomeles*, *Heteromeles*, *Holodiscus*, *Horkelia*, *Horkeliella*, *Ivesia*,
25 *Kageneckia*, *Kelseya*, *Kerria*, *Leucosidea*, *Lindleya*, *Luetkea*, *Lyonothamnus*, *Maddenia*,
Malacomeles, *Malus*, *Margyricarpus*, *Mespilus*, *Neillia*, *Neviusia*, *Nuttalia*, *Oemleria*, *Orthurus*,
Osteomeles, *Pentactina*, *Peraphyllum*, *Petrophytum*, *Photinia*, *Physocarpus*, *Polylepis*,
Potanina, *Potentilla*, *Poterium*, *Prinsepia*, *Prunus*, *Pseudocydonia*, *Purshia*, *Pyracantha*, *Pyrus*,
Quillaja, *Rhaphiolepis*, *Rhodotypos*, *Rosa*, *Rubus*, *Sanguisorba*, *Sarcopoterium*, *Sibbaldia*,
30 *Sibiraea*, *Sorbaria*, *Sorbus*, *Spenceria*, *Spiraea*, *Spiraeanthus*, *Stephanandra*, *Taihangia*,
Tetraglochin, *Torminalis*, *Vauquelinia*, *Waldsteinia*, *Xerospiraea*.

De préférence, le dispositif selon l'invention est adapté pour étudier des plantes, ou parties de plantes, appartenant à l'une des espèces suivantes : *Prunus armeniaca*, *Prunus dulcis*, *Prunus avium*, *Cydonia oblonga*, *Rosa canina*, *Fragaria*, *Rubus idaeus*, *Rubus fruticosus*
35 *agg*, *Mespilus germanica*, *Prunus persica*, *Rubus chamaemorus*, *Pyrus communis*, *Malus domestica*, *Prunus domestica*.

Encore de préférence, le dispositif est destiné à l'étude du pommier, ou *Malus domestica*.

Dans ce cas, le présent dispositif peut être employé pour toutes les variétés de pommier, et en particulier les variétés suivantes : Golden Delicious, MM106 et Evereste.

Méthode utilisant le dispositif selon l'invention

5 De manière générale, le dispositif selon l'invention peut être employé pour l'étude de l'état de stimulation des défenses naturelles sur une plante ou une partie de la plante (ou une pluralité de plantes ou de parties de plantes).

En pratique, le profil d'expression d'une pluralité d'échantillons d'acides nucléiques et/ou protéines, provenant de plusieurs plantes et/ou parties de plantes, est déterminé au moyen d'un
10 ou d'une série de dispositifs selon l'invention.

Cette démarche permet de tenir compte des éventuelles variations dans l'expression des gènes entre les plantes et/ou parties de plantes, et ainsi obtenir des résultats fiables.

Parallèlement, des échantillons contrôles sont avantageusement étudiés et analysés avec les dispositifs selon l'invention.

15 Par exemple, les échantillons de contrôle (ou les échantillons de référence) peuvent être obtenus à partir de plantes ou de parties de plantes dont l'état de stimulation des défenses naturelles est connu.

Ainsi, les échantillons de contrôle peuvent être issus de plantes ou de parties de plantes qui sont non-traitées et non-stressées, ou qui sont soumises préalablement à un composé
20 stimulateur des défenses naturelles et/ou un stress.

Ensuite, afin de déterminer l'état de stimulation des défenses naturelles de végétaux d'intérêt (ayant un état de stimulation des défenses naturelles inconnu), les échantillons obtenus à partir de ces plantes ou parties de plantes seront comparés avec des échantillons provenant de plantes ou parties de plantes dont l'état de stimulation des défenses naturelles est
25 connu.

Ainsi, plusieurs échantillons peuvent être analysés au moyen du dispositif selon l'invention, tels que des échantillons d'acides nucléiques et/ou de protéines provenant (i) de plantes ou parties de plantes dont l'état de stimulation des défenses naturelles est connu, (ii) de plantes ou parties de plantes dont l'état de stimulation des défenses naturelles est inconnu, (iii)
30 de plantes ou parties de plantes préalablement soumises à au moins un stress biotique et/ou abiotique ou (iv) de plantes ou parties de plantes préalablement soumises à au moins un produit pour vérifier ou pour rechercher un effet stimulateur des défenses naturelles.

Le dispositif selon l'invention peut ainsi être mis en œuvre dans un ensemble de procédés, dont certains sont présentés en détails ci-après.

35

Procédé pour identifier un profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles

Une première application du dispositif selon l'invention est l'identification de profils d'expression de la combinaison précitée de gènes cibles, encore désignés « signatures », qui

permettrait de déterminer, ou au moins d'évaluer, l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes.

Le procédé pour identifier un profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles comprend les étapes suivantes :

5 (i) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles au moyen du dispositif selon l'invention, sur un ensemble de plantes, ou parties de plantes, appartenant avantageusement à la famille des *Rosaceae*, dont l'état de stimulation des défenses naturelles est connu, puis

10 (ii) déterminer un profil d'expression d'intérêt de ladite combinaison de gènes cibles correspondant à un état déterminé de stimulation des défenses naturelles desdites plantes ou parties de plantes, partant des données issues de l'étape (i).

Au moyen du dispositif selon l'invention et au cours de l'étape (i), on obtient au moins une valeur quantitative d'expression pour chacun des marqueurs biologiques utilisés.

15 L'obtention de plusieurs valeurs quantitatives, pour chaque marqueur biologique utilisé, permet un pronostic plus précis de l'état de stimulation des défenses naturelles.

Ces quantifications sont mises en œuvre sur des échantillons de plantes ou de parties de plantes dont l'état de stimulation des défenses naturelles est connu, choisis avantageusement parmi :

- 20 - les échantillons de plantes ou de parties de plantes non soumises à un stress et/ou à un produit stimulateur des défenses naturelles ; ou
- les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stress ; ou
- les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un produit stimulateur des défenses naturelles.

25 Par exemple, pour obtenir des échantillons représentatifs d'un stress biotique, on peut pulvériser du peroxyde d'hydrogène sur les plantes ou de parties de plantes.

Pour obtenir des témoins négatifs, on peut pulvériser de l'eau osmosée sur les plantes ou de parties de plantes.

Pour obtenir des échantillons représentatifs d'une protection vis-à-vis du feu bactérien, on peut appliquer du Bion® sur les plantes ou de parties de plantes.

30 L'étape (ii) consiste à comparer les valeurs quantitatives obtenues à l'étape (i) pour chaque marqueur biologique.

Les valeurs d'expression de référence pour chacun des gènes cibles peuvent ainsi être déterminées.

35 Elles constituent ensemble « un profil de référence » qui est pertinent pour distinguer et/ou identifier et/ou déterminer une modification de l'état de stimulation des défenses naturelles.

Chaque profil de référence déterminé pour ladite combinaison de marqueurs biologiques est ainsi corrélé à un état de stimulation des défenses naturelles.

Selon un mode de réalisation avantageux, les profils de référence, pour la combinaison de marqueurs biologiques selon l'invention, peuvent être prédéterminé par la réalisation d'un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) fournir au moins une collection d'échantillons de plantes ou de parties de plantes, dont l'état de stimulation des défenses naturelles est déterminé ;
- b) quantifier au moyen du dispositif selon l'invention, pour chaque échantillon fourni à l'étape a), le niveau d'expression desdits marqueurs biologiques, par lequel une série de valeurs quantitatives pour les marqueurs biologiques de ladite collection d'échantillons est obtenue ;
- 10 c) déterminer, à partir de ladite série de valeurs de quantification obtenue à l'issue de l'étape b), une corrélation entre un profil déterminé d'expression desdits marqueurs biologiques et un état spécifique de stimulation des défenses naturelles.

Certains profils d'expression intéressants, obtenus au moyen du dispositif selon l'invention, sont présentés dans les exemples.

15 Procédé pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles

Le dispositif selon l'invention a également l'intérêt de pouvoir être mis en œuvre dans le cadre d'un procédé pour l'analyse de l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou partie de plante.

20 Le procédé pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante comprend les étapes suivantes :

- (i) prélever un échantillon à partir de la plante ou à partir de ladite partie de plante, appartenant avantageusement à la famille des *Rosaceae*, ayant éventuellement subie tout traitement d'intérêt (par exemple stress ou stimulateur des défenses naturelles),
- (ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans ledit échantillon
25 prélevé à l'étape (i), au moyen du dispositif selon l'invention,
- (iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence,
- (iii) déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles de ladite plante ou de ladite partie de plante, à partir dudit profil d'expression obtenu lors de l'étape (ii).

30 Le profil d'expression obtenu à l'étape (ii), au moyen du dispositif selon l'invention, est comparé avec un profil d'expression de référence qui correspondent aux valeurs observées pour des échantillons de plantes ou de parties de plantes choisis avantageusement parmi :

- les échantillons de plantes ou de parties de plantes non soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles ; ou
- les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stress (par exemple *E. amylovora*) ; ou
- 35 - les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stimulateur des défenses naturelles (par exemple Bion®).

En particulier, la surexpression d'au moins un gène cible, et de préférence encore d'une combinaison de gènes cibles, dans un échantillon étudié, en comparaison d'échantillons de

plantes ou de parties de plantes non soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles, permet d'identifier les plantes ou parties de plantes présentant un état de stimulation des défenses naturelles qui est activé ou induit.

5 De même, l'expression constante d'au moins un gène cible, et de préférence encore d'une combinaison de gènes cibles, dans un échantillon étudié, en comparaison d'échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles, permet d'identifier les plantes ou parties de plantes présentant un état de stimulation des défenses naturelles qui est activé ou induit.

10 Procédé pour sélectionner une substance ayant la propriété de moduler l'état de stimulation des défenses naturelles

Il existe un besoin pour de nouveaux agents stimulateurs de défenses naturelles, et de méthodes fiables et faciles pour le dépistage d'un grand nombre de composés biologiques ou chimiques, ou de compositions, pour leur utilisation comme agents stimulateurs de défenses
15 naturelles.

Il existe également un besoin de vérifier l'activité biologique de composés ou de compositions présentés comme stimulateurs de défenses naturelles.

Le dispositif selon l'invention constitue un outil particulièrement intéressant pour identifier de tels composés biologiques ou chimiques, ou de telles compositions contenant de
20 ces composés biologiques ou chimiques, qui soient capables de stimuler les défenses naturelles d'une plante ou partie de plante, appartenant avantageusement à la famille des *Rosaceae*.

L'outil selon l'invention permet en particulier de cribler toute composé actif ou composition active, biologique ou chimique, employé dans le domaine de l'agriculture, de
25 préférence de l'arboriculture et de préférence encore dans le domaine des *Maloideae*.

L'identification d'un tel effet supplémentaire permettrait d'éviter les traitements redondants (notamment par l'application de deux composés activant les mêmes mécanismes de défenses) et de limiter les interactions négatives (certains produits SDN ont des effets antagonistes au regard des voies moléculaires qu'ils régulent).

30 Le procédé de mise en œuvre du dispositif selon l'invention comprend avantageusement les étapes suivantes :

(i) la mise en contact, avec une plante ou partie de la plante (appartenant avantageusement à la famille des *Rosaceae*), d'un ou plusieurs composés biologiques ou chimiques, ou des compositions comprenant un ou plusieurs composés biologiques ou chimiques,

35 (ii) la détermination du profil d'expression de la combinaison de gènes cibles dans un échantillon prélevé à partir de ladite plante traitée ou de ladite partie de plante traitée suite à l'étape (i), au moyen du dispositif selon l'invention,

(iii) la comparaison du profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence, pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles dans ledit échantillon,

5 (iv) la sélection positive de ladite substance si la comparaison à l'étape (iii) montre que ladite substance testée à l'étape (i) module l'état de stimulation des défenses naturelles dudit plant ou de ladite partie de plant.

Dans l'étape (i), tout composé biologique ou chimique, ou toute composition comprenant un ou plusieurs composés biologiques ou chimiques, peuvent être mis en contact avec les plantes ou parties de plantes.

10 Au moins deux composés et/ou compositions différents peuvent être mise en contact, simultanément ou successivement, avec les plantes ou parties de plantes.

De préférence, chaque composé ou composition est mis en contact physique avec une ou plusieurs plantes individuelles.

15 Ce contact peut également être réalisé par différents moyens, tels que la pulvérisation, le brossage, l'application de solutions ou de solides dans ou sur la terre, dans la phase gazeuse entourant les plantes ou parties de plantes, par immersion, etc.

Les composés ou compositions testées peuvent être solides, liquides, semi-solides ou gazeux.

20 Les composés ou compositions testées peuvent être synthétisés artificiellement ou naturels, comme les protéines, fragments de protéines, composés organiques volatils, plantes ou animaux ou extraits de micro-organisme, les métabolites, les sucres, les graisses et huiles, les microorganismes comme les virus, bactéries, champignons, etc.

Le composé ou la composition biologique comprend encore, ou est constituée, d'un ou de plusieurs micro-organismes, ou un ou plusieurs extraits de plantes.

25 Le profil d'expression obtenu à l'étape (ii), au moyen du dispositif selon l'invention, est comparé selon une méthode décrite précédemment, c'est-à-dire par exemple avec un profil d'expression de référence qui correspondent aux valeurs observées pour des échantillons de plantes ou de parties de plantes choisis avantageusement parmi :

- 30
- les échantillons de plantes ou de parties de plantes non soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles ; ou
 - les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stress (par exemple *E. amylovora*) ; ou
 - les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stimulateur des défenses naturelles (par exemple Bion®).

35 En particulier, la surexpression d'au moins un gène cible, et de préférence encore d'une combinaison de gènes cibles, dans un échantillon étudié, en comparaison d'échantillons de plantes ou de parties de plantes non soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles, permet d'identifier les plantes ou parties de plantes présentant un état de stimulation des défenses naturelles du fait de l'action du composé testé ou de la composition testée.

Par exemple, la surexpression de la combinaison de gènes cibles PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 et WRKY permet de sélectionner une substance ayant la propriété de générer un état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie de plante appartenant à la famille des *Rosaceae*, qui assure une protection vis à vis de stress biotiques.

De préférence, ce profil d'expression permet la sélection d'une substance ayant la propriété de générer un état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie de plante appartenant à la famille des *Rosaceae*, qui assure une protection vis à vis de *Erwinia amylovora*.

En particulier, cette surexpression pour chacun des gènes cibles précités consiste en un niveau de surexpression relative (avantageusement par rapport à un traitement à l'eau) supérieur à 3 (ou $\log_2(\text{expression relative}) > 1,58$).

De même, l'expression constante d'au moins un gène cible, et de préférence encore d'une combinaison de gènes cibles, dans un échantillon étudié, en comparaison d'échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stimulateur des défenses naturelles, permet d'identifier les plantes ou parties de plantes présentant un état de stimulation des défenses naturelles du fait de l'action du composé testé ou de la composition testée.

La plante ou partie de plante traitée peut éventuellement être soumise simultanément à un stress abiotique (environnemental), afin d'étudier l'effet de conditions de culture stressantes sur l'efficacité des stimulateurs de défenses naturelles.

L'outil selon l'invention peut permettre de sélectionner, et distinguer, des composés stimulateurs directs et des composés potentialisateurs.

Pour cela, on peut par exemple étudier le changement du profil d'expression des gènes cibles suite à l'application d'un stress biotique, avec ou sans application préalable d'un composé ou d'une composition d'intérêt.

La surexpression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon après l'application d'un stress biotique, en comparaison d'échantillons de plantes ou de parties de plantes non soumise à un tel stress biotique, permet d'identifier les composés potentialisateurs (ou au moins susceptible d'avoir un tel effet potentialisateur).

Procédé pour sélectionner une plante ou une partie de plante

La présente invention porte également sur l'identification et la sélection de plantes, appartenant avantageusement à la famille des *Rosaceae*, présentant un état particulier de stimulation des défenses naturelles, que cet état soit obtenu :

(a) naturellement (par croisement ou l'utilisation des variations naturelles) ou artificiellement (en induisant des variations, par exemple par transgénèse des plantes ou des parties de plantes, ou par mutagénèse en utilisant un ou plusieurs agents mutagènes) ; et/ou

(b) suite à l'application d'un composé ou d'une composition stimulatrice des défenses naturelles ; et/ou

(c) suite à l'application d'un ou de plusieurs stress biotique(s) et/ou abiotique(s).

En effet, le dispositif selon l'invention constitue un outil intéressant pour sélectionner une plante, appartenant de préférence à la famille des *Rosaceae*, présentant un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de leur conférer une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt.

Une méthode pour sélectionner une plante ou partie de la plante ayant un état de stimulation des défenses naturelles améliorée (et donc avec résistance renforcée aux stress biotiques et/ou abiotiques), peut comprendre les étapes suivantes :

(i) appliquer le ou les stress, et/ou le ou les stimulateurs de défenses naturelles, à une plante ou une partie de plante, appartenant avantageusement à la famille des *Rosaceae*,

(ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon prélevé à partir de ladite plante ou de ladite partie de plante, au moyen du dispositif selon l'invention,

(iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence, pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles dans ledit échantillon,

(iv) sélectionner positivement ladite plante si la comparaison de l'étape (iii) montre que ledit plant ou ladite partie de plant possède un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de leur conférer une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt.

La plante ou partie de la plante sélectionnée à l'étape (iv) comporte avantageusement un état particulier de stimulation des défenses naturelles, en présence d'agents stimulateurs des défenses naturelles et/ou de stress biotiques et/ou de stress abiotiques.

Le profil d'expression obtenu à l'étape (ii), au moyen du dispositif selon l'invention, est comparé selon une méthode décrite précédemment, c'est-à-dire par exemple avec un profil d'expression de référence qui correspondent aux valeurs observées pour des échantillons de plantes ou de parties de plantes choisis avantageusement parmi :

- les échantillons de plantes ou de parties de plantes non soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles ;

- les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stimulateur des défenses naturelles ; ou

- les échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stress.

La surexpression d'au moins un gène cible, et de préférence encore d'une combinaison de gènes cibles, dans un échantillon étudié, en comparaison d'échantillons de plantes ou de parties de plantes soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles, permet d'identifier les plantes ou parties de plantes présentant un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de présenter une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt.

Le dispositif selon l'invention permet ainsi de cribler les génotypes pour leur réactivité aux produits SDN.

Séquences

SEQ ID N°1 à 31 : séquences des ADNc issus des gènes cibles et des gènes de références ;
 SEQ ID N°32 à 93 : séquences d'amorces PCR pour l'amplification des séquences SEQ ID N°1 à 31

5

Figures

Figure 1 : Efficacité de protection de 10 SDN candidats contre *E. amylovora* sur semis de Pommier. L'eau et la Plantomycine (Plantom.) sont utilisées comme témoins négatifs et positifs respectivement.

10 RC : régulateur de croissance ; Eclairciss : éclaircisseurs ; Représentation en boîtes à moustaches, ces dernières indiquant les intervalles de confiance des médianes ($P=0.05$) ; Au moins six répétitions biologiques de 10 semis de 2 expériences indépendantes.

15 Figure 2 : A) Modulation de l'expression des 28 gènes de l'outil dans des feuilles de 4 variétés de Pommier (scions greffés) 3 jours après traitement au Bion ou à l'eau. Différences d'expression par rapport à un prélèvement effectué à J0 sur des plantes non traitées de chaque génotype. Une répétition biologique. B) Efficacité moyenne de protection vis-à-vis du feu bactérien effectuée en parallèle ($n=12$).

Exemple

20

Matériel :*Dispositif selon l'invention*

25 Plaque de microtitration 96-puits prête à l'emploi, contenant les couples d'amorces SEQ ID n°32 à 93 pour (i) les 28 gènes cibles SEQ ID n°1 à 28 et (ii) les 3 gènes de référence SEQ ID n°29 à 31, (répartis dans trois puits pour chaque couple) sous forme déshydratées (évaporation une nuit à 60°C) et en quantité suffisante pour atteindre les concentrations finales optimales détaillées dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 : Amorces et concentrations optimales pour la technique PCR

Nom du gène	Amorces	SEQ ID	Taille amplicon (bp)	Concentration optimale (nm)
PR-1	PR1-di	32	167	200
	PR1-re	33		
PR-2	PR2-di	34	152	400
	PR2-re	35		
PR-4	PR4-di	36	123	200
	PR4-re	37		
PR-5	PR5-di	38	100	600
	PR5-re	39		
PR-8	PR8-di	40	173	200
	PR8-re	41		

Nom du gène	Amorces	SEQ ID	Taille amplicon (bp)	Concentration optimale (nm)
PR-14	PR14-di	42	192	200
	PR14-re	43		
PR-15	PR15-di	44	132	200
	PR15-re	45		
PAL	PAL-di	46	133	200
	PAL-re	47		
CHS	CHS-di	48	234	100
	CHS-re	49		
DFR	DFR-di	50	239	200
	DFR-re	51		
ANS	ANS-di	52	298	200
	ANS-re	53		
PPO	PPO-di	54	124	200
	PPO-re	55		
HMGR	HMGR-di	56	206	400
	HMGR-re	57		
FPPS	FPPS-di	58	255	200
	FPPS-re	59		
Far	Far-di	60	161	200
	Far-re	61		
CSL	CSL-di	62	134	200
	CSL-re	63		
APOX	APX-di	64	185	200
	APX-re	65		
GST	GST-di	66	185	200
	GST-re	67		
POX	POX-di	68	197	100
	POX-re	69		
CalS	CalS-di	70	176	200
	CalS-re	71		
Pect	Pect-di	72	173	300
	Pect-re	73		
CAD	CAD-di	74	85	200
	CAD-re	75		
EDS1	EDS1-di	76	269	200
	EDS1-re	77		
WRKY	WRKY-di	78	171	200
	WRKY-re	79		
LOX2	LOX2-di	80	199	100
	LOX2-re	81		
JAR	JAR-di	82	118	200
	JAR-re	83		

Nom du gène	Amorces	SEQ ID	Taille amplicon (bp)	Concentration optimale (nm)
ACCO	ACCO-di	84	193	200
	ACCO-re	85		
EIN3	EIN3-di	86	212	400
	EIN3-re	87		
TuA	TuA-di	88	118	300
	TuA-re	89		
Actin	Actin-di	90	140	100
	Actin-re	91		
GAPDH	GAPDH-di	92	103	300
	GAPDH-re	93		

Essai 1 - Expression relative des gènes de défense dans des feuilles de pommiers soumis à différents traitements

5

Protocole :

L'expression des 28 gènes cibles a été suivie (i) dans des feuilles de semis de Pommier (obtenus par pollinisation libre de la variété Golden Delicious, voir Brisset et al. Eur. J. Plant Pathol. 106, 529-536, 2000) soumis à des traitements de type SDN et à divers stress abiotiques, ainsi que (ii) dans des feuilles de scions greffés de deux génotypes de Pommier, Everest et MM106 (voir Venisse et al. Molecular Plant-Microbe Interactions 15, 1204-1212, 2002), après infection par *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien.

Le protocole mis en œuvre comprend les étapes 1 à 7 suivantes :

1) Traitement des plants par pulvérisation, arrosage ou infiltration du produit (ou d'eau osmosée pour les témoins négatifs).

Les divers traitements ont été appliqués de la manière suivante :

- Baba (a.i. 95% acide DL- β -amino-n-butyrique, Sigma ref A-2004) appliqué par arrosage d'une solution 10 mM (5 ml par pot de 150 ml),
- Bion® (a.i. 50% acibenzolar-S-methyl, Syngenta) appliqué par pulvérisation jusqu'à ruissellement d'une solution à 0,4 g/l,
- Rhodofix® (a.i. 1% acide α -naphtylacétique, Nufarm SAS) appliqué par pulvérisation jusqu'à ruissellement d'une solution à 1,5 g/l,
- Régalis® (a.i. 10% prohexadione-calcium, BASF Agro, BASF Agro) appliqué par pulvérisation jusqu'à ruissellement d'une solution à 2,5 g/l,
- PRM® 12 RP (a.i. 11,3% éthéphon, Bayer CropScience) appliqué par pulvérisation jusqu'à ruissellement d'une solution à 3 ml/l,
- MeJA (a.i. 95% methyl jasmonate, Aldrich ref 39,270-7) appliqué par arrosage d'une solution 10 mM (5 ml par pot de 150 ml),
- Deshydratation appliquée par arrêt de l'arrosage,

- PEG (a.i. polyéthylène glycol 6000, Merck ref 807491) appliqué par imbibition jusqu'à saturation du terreau (2 fois 3 mn) à l'aide d'une solution à 36%,

- Paraquat (a.i. paraquat dichloride x-hydrate PESTANAL®, Fluka ref 36541) appliqué par pulvérisation jusqu'à ruissellement d'une solution 100 µM,

5 - H₂O₂ (a.i. 30% peroxyde d'hydrogène) appliqué par pulvérisation jusqu'à ruissellement d'une solution à 10 ml/l,

- *E. amylovora* appliqué par infiltration d'une suspension de la souche CFBP1430 ajustée à 10⁷ cfu/ml.

10 2) Pulvérisation optionnelle de peroxyde d'hydrogène 24h après l'étape 1), pour mimer l'attaque par un pathogène (ce qui permet de différencier les stimulateurs directs et les potentialisateurs).

3) Prélèvement de tissus 24h, 48h et 72h après traitement.

4) Congélation immédiate des tissus dans l'azote liquide et conservation à -80 °C.

15 5) Extraction d'ARN, reverse-transcription, vérification d'absence d'ADN génomique selon Venisse et al. (Molecular Plant-Microbe Interactions 15, 1204-1212, 2002).

6) Amplification par PCR quantitative de chaque extrait en préparant le mix suivant : 5 µg d'ADNc, X µl de mix qPCR selon les instructions du fournisseur, et qsp 2500 µl eau ultrapure, en le distribuant à raison de 25 µl par puits de la plaque 96-puits prête à l'emploi, et en effectuant l'amplification selon un programme qPCR de 40 cycles.

20 7) Exploitation des résultats selon la méthode du $\Delta\Delta C_t$ qui fournit les expressions relatives des gènes de défense dans un échantillon donné par rapport à un échantillon non traité appelé « calibrateur », expressions normalisées par la moyenne géométrique des gènes de référence de ces échantillons, (Vandesompele et al., Genome Biol. 3(7) : research0034.1-0034.11, 2002 ; Livak et Schmittgen, Methods 25:402-408, 2001).

25 Les résultats d'expression des 28 gènes cibles sont détaillés dans les tableaux 4, 5 et 6 ci-après, consistant en une matrice des expressions relatives par rapport à des témoins « eau » (prélevés aux mêmes temps) transformées en log de base 2 (J=jour, h=heure).

Ces résultats sont répartis dans trois tableaux, uniquement dans un souci de présentation.

30 Résultats :

a) Les produits Bion, Rhodofix et Régalis montrent une activation assez similaire de la combinaison de gènes suivants : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 et WRKY, avec des niveaux de surexpression relative (par rapport à l'eau) souvent bien supérieurs à 3 (ou $\log_2(\text{expression relative}) > 1,58$, tableaux 4 à 6).

35 Ces trois produits assurent par ailleurs une protection significative et reproductible vis-à-vis du feu bactérien.

Il est intéressant de noter que parmi ces 3 produits, seul le Bion (analogue de l'acide salicylique) est homologué comme SDN (sur des espèces autres que le Pommier).

Les inventeurs ont déjà montré son efficacité de protection vis-à-vis du feu bactérien, mais également envers la tavelure et le puceron cendré, protection corrélée à l'accumulation de quelques protéines de défense (Brisset et al., 2000 et 2005).

5 Le Rhodofix (analogue d'auxine) est un éclaircisseur utilisé dans les vergers de Pommier pour alléger la charge en fruits.

D'après les présents essais, ce produit aurait également des effets de stimulation de défense, ce qui n'a jamais été décrit.

Quant au Régalis (inhibiteur de gibbérellines par inhibition de dioxygénases), il est également utilisé dans les vergers de Pommier comme réducteur de croissance des pousses.

10 Les inventeurs ont déjà démontré sa capacité de protection vis-à-vis du feu bactérien, qui pouvait être liée à la réduction de croissance (Brisset et al., 2005).

Les analyses d'expression de gènes montrent qu'il a également la capacité d'induire des défenses, en particulier de type protéines PR, ce qui, là encore, n'a jamais été décrit.

15 b) Les deux produits MeJA et PRM 12 montrent de leur côté une activation assez similaire d'une combinaison de gènes de défense : PR-14, PAL, CHS, DFR, CSL, Pect, ACCO et EIN3 avec des niveaux de surexpression relative par rapport à l'eau souvent supérieurs à 3 (ou $\log_2(\text{expression relative}) > 1,58$, tableaux 4 à 6).

20 Au niveau protection, ces deux produits montrent une efficacité très variable suivant les essais mais, dans le meilleur des cas, n'atteint jamais l'efficacité des produits Bion, Rhodofix et Régalis.

Il est à remarquer que PRM 12 (analogue de l'éthylène) est également un éclaircisseur utilisé dans les vergers de Pommier.

Au vu des présents résultats, le Rhodofix devrait être préféré au PRM 12 pour sa double fonction d'éclaircisseur et de stimulateur de défenses.

25 c) Le Baba appliqué dans nos conditions expérimentales (arrosage) montre peu d'effet sur les modulations de gènes et aucun effet de protection vis-à-vis du feu bactérien.

Il représente donc un témoin négatif dans nos expériences. Il valide également l'utilisation de l' H_2O_2 dans le mode opératoire. En effet le Baba est connu comme potentialisateur et non comme stimulateur direct, son action sur les défenses n'étant révélée qu'après le stress provoqué par un agent pathogène.

30 Dans notre mode opératoire, l'action de ce dernier est simulée par l'application d' H_2O_2 . Les résultats montrent bien que ce traitement supplémentaire déclenche l'expression de quelques gènes (POX, Pect par exemple) qui ne sont pas activés par le seul traitement Baba.

35 Ce phénomène en revanche n'est pas clairement observé pour les autres stimulateurs qui semblent donc être plutôt des stimulateurs directs.

d) Vu dans leur ensemble, les résultats obtenus avec les 6 produits type SDN semblent indiquer que la surexpression des gènes PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 et WRKY (avantageusement avec des niveaux d'expression relative,

par rapport à l'eau, supérieurs à 3), permet d'assurer une protection significative vis-à-vis du feu bactérien en conditions contrôlées.

En revanche, la surexpression des gènes PR-14, PAL, CHS, DFR, CSL, Pect, ACCO et EIN3 (avec des niveaux d'expression relative par rapport à l'eau avantageusement supérieurs à 3) ne permet pas d'assurer cette protection.

e) Les stress abiotiques ont été appliqués en vue de répondre à deux questions : i) peut-on avoir des artefacts sur l'expression des gènes de défense si les expérimentations de produits type SDN se déroulent dans des conditions environnementales plus contraignantes pour les plantes (c'est-à-dire observer des activations de gènes dues aux conditions stressantes et non aux SDN) et ii) des conditions environnementales stressantes empêchent-elles la réaction des plantes aux SDN (ce qui aurait alors un impact pour la réussite des traitements en verger).

Les résultats actuels répondent en partie à la première question. Les stress hydrique (déshydratation), osmotique (PEG) et faiblement oxydant (H_2O_2 - servant également de témoin pour les tests de potentialisation) ne modulent que faiblement les expressions des gènes cibles. Seul un fort stress oxydant (paraquat = herbicide provoquant la production d'ion superoxyde) active fortement quelques gènes mais dans l'ensemble, les activations sont plus faibles que celles obtenues avec le Bion par exemple.

f) Les réponses des gènes à une infection par *E. amylovora* montre que cette bactérie module dans l'ensemble les mêmes gènes cibles que les traitements Bion, Rhodofix ou Régalis, mais souvent avec une amplitude plus faible, en particulier pour les gènes de protéines PR.

Comme la bactérie réprime fortement les gènes des voies de l'acide jasmonique et des phénylpropanoïdes, on aurait pu s'attendre à ce que des produits provoquant l'effet inverse de type MeJA ou PRM 12 soient efficaces en terme de protection, ce qui n'est pas le cas dans nos conditions expérimentales.

Les résultats dans leur ensemble montrent au contraire que les produits qui assurent une protection significative activent la même combinaison de gènes que la bactérie elle-même (PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 et WRKY).

Tableau 4

Expression relative des gènes de défense dans des feuilles de pommiers soumis à différents traitements (SDN potentiels, stress abiotiques, infection par *E. amylovora*)

Traitements	Délai de prélèvement	PR-1	PR-2	PR-4	PR-5	PR-8	PR-14	PR-15	PAL	ANS	
Baba	J2	1,85	3,04	3,00	2,75	0,02	-0,29	1,84	0,42	1,28	
	-H ₂ O ₂	J2	-0,70	0,24	-0,71	0,92	0,10	-2,34	-0,53	0,27	1,53
	J3	0,01	0,20	-2,45	-0,26	-0,37	-3,35	0,04	0,20	-1,09	
	J3	2,08	-1,69	-0,57	0,86	-0,52	3,90	1,82	0,29	-0,10	
	+H ₂ O ₂	J2	5,93	8,90	6,58	2,84	3,33	6,56	0,84	0,29	1,41

Traitements	Délai de prélèvement	PR-1	PR-2	PR-4	PR-5	PR-8	PR-14	PR-15	PAL	ANS	
	J2	0,08	-0,98	0,16	-0,40	0,39	-2,63	0,71	0,55	2,12	
	J3	2,71	4,26	-2,18	1,91	1,39	-0,53	1,46	-0,84	0,19	
	J3	1,77	-2,32	-0,86	1,34	-1,00	1,17	2,06	-0,12	1,25	
Bion	-H ₂ O ₂	J2	8,37	6,89	8,61	5,77	6,07	3,31	1,88	-0,14	1,51
		J2	3,20	9,64	7,17	1,02	3,50	3,75	1,61	1,11	0,21
		J3	5,99	7,99	5,43	4,46	2,23	4,09	-1,98	-1,29	-1,56
		J3	2,14	1,61	8,07	3,88	1,62	0,49	4,96	-0,15	0,14
	+H ₂ O ₂	J2	8,53	11,96	10,25	6,52	5,57	2,22	4,09	-0,25	-0,15
		J2	3,87	6,36	5,10	2,43	3,25	2,95	1,72	1,91	1,50
		J3	7,66	13,12	6,37	4,11	2,74	5,01	1,33	-2,25	-4,05
		J3	5,35	7,07	8,03	5,68	3,62	4,52	3,60	0,83	0,14
Rhodofix	-H ₂ O ₂	J2	2,61	9,34	6,87	1,75	3,16	5,43	0,98	1,78	2,40
		J3	5,99	7,56	9,06	3,15	3,56	6,59	2,93	0,32	0,77
	+H ₂ O ₂	J2	3,87	6,85	7,42	2,72	3,19	4,49	4,83	1,15	1,49
		J3	6,47	6,19	8,82	3,13	3,74	4,29	3,15	0,14	1,29
Régalis	-H ₂ O ₂	J2	4,76	3,80	3,25	2,42	4,07	7,55	2,77	0,22	1,31
		J2	2,08	5,91	3,45	-0,84	2,29	3,31	1,12	1,36	0,77
		J3	3,62	4,38	3,09	0,96	1,36	0,79	-0,08	0,64	-0,05
		J3	4,11	3,84	3,80	1,22	1,91	6,20	1,37	0,58	2,70
	+H ₂ O ₂	J2	4,02	11,09	8,82	4,24	4,07	5,07	0,63	0,81	2,37
		J2	1,85	1,57	6,39	-1,92	2,72	4,80	6,12	2,69	1,92
		J3	4,00	8,88	2,56	1,46	1,00	4,66	3,73	-0,51	-1,58
		J3	1,99	0,07	2,72	1,66	-0,39	2,50	0,54	0,12	0,06

PRM12	-H ₂ O ₂	J2	0,34	2,00	0,96	0,61	0,37	0,16	0,30	0,41	0,19
		J3	1,13	-1,11	5,13	-0,73	2,56	5,92	5,40	4,10	4,49
	+H ₂ O ₂	J2	2,41	1,94	0,14	-0,17	0,91	1,90	2,46	1,38	3,45
		J3	1,89	-2,70	0,21	1,64	-0,30	5,05	3,13	-0,33	2,86
MeJA	-H ₂ O ₂	J2	1,56	4,03	2,68	-0,59	1,85	3,45	-0,19	3,17	2,31
		J3	2,35	3,69	2,63	1,49	1,00	5,09	1,21	1,66	1,58
	+H ₂ O ₂	J2	0,40	3,89	1,25	-2,09	1,41	-0,64	3,20	3,36	3,29
		J3	2,84	0,66	2,84	-1,22	1,51	3,66	2,77	2,01	1,44
Deshydratation	J2	-2,01	-1,80	-4,15	0,57	0,39	-2,11	1,82	-2,26	0,60	
	J4	-0,91	-1,65	-4,21	0,00	0,00	-0,56	0,00	-0,12	0,00	
	J7	1,12	-1,28	-4,36	1,20	0,70	2,71	3,01	-1,54	-1,25	
	J10	0,47	-1,06	-3,33	2,49	2,15	3,09	2,66	-2,12	-1,24	
PEG	J1	2,56	4,72	3,01	0,00	0,00	1,46	0,00	0,41	0,00	
	J2	4,07	0,29	1,00	-3,97	-1,15	6,49	-0,87	0,20	1,02	
	J2	-2,07	-2,05	-5,05	1,44	0,15	3,82	1,10	-4,43	-1,86	
	J3	1,07	0,69	3,92	-11,1	1,75	5,87	-6,54	0,68	3,82	
	J4	-1,32	-1,24	1,64	-0,20	1,60	5,33	1,83	-0,64	0,02	
	J7	0,92	-2,37	0,03	-1,07	1,52	8,06	1,51	-2,10	0,21	
	J10	0,16	-1,62	2,30	-1,38	1,63	5,71	1,61	-2,72	-1,37	
Paraquat	J1	0,55	4,09	7,10	0,00	0,00	2,61	0,00	1,99	0,00	

Traitements	Délai de prélèvement	PR-1	PR-2	PR-4	PR-5	PR-8	PR-14	PR-15	PAL	ANS
	J2	3,00	5,88	6,93	-3,05	5,12	6,04	4,77	2,56	-2,09
	J3	0,54	2,53	6,63	-8,56	5,36	1,28	-0,34	0,66	-0,78
H ₂ O ₂	J2	2,44	4,75	2,53	3,02	0,83	-1,92	-0,20	1,91	-0,58
	J2	-2,09	3,92	4,27	-0,64	0,79	-1,17	1,35	0,91	0,82
	J3	0,66	2,36	-2,25	0,41	0,38	0,70	-0,82	-0,87	-2,02
	J3	4,31	3,38	6,36	4,37	2,00	3,18	1,32	-0,06	0,17
<i>E. amylovora</i>	6h	4,82	7,68	6,71	1,45	5,90	4,20	6,54	1,49	-2,33
	6h	1,56	1,28	4,30	5,49	6,86	3,90	4,82	0,87	0,61
	24h	5,24	3,14	5,19	1,98	5,04	3,90	9,64	0,44	-0,82
	24h	4,18	-0,65	2,91	-0,65	3,82	2,00	9,00	-0,63	-2,17

Tableau 5

Expression relative des gènes de défense dans des feuilles de pommiers soumis à différents traitements (SDN potentiels, stress abiotiques, infection par *E. amylovora*)

Traitement s	Délai de prélèvement	CHS	DFR	PPO	HMG R	FPPS	Far	CSL	APOX	GST	
Baba	-H ₂ O ₂	J2	0,27	0,64	-0,06	1,22	-0,02	0,85	-0,37	0,02	-0,05
		J2	0,29	0,93	-1,07	-0,67	-0,41	-0,28	0,38	2,14	-0,34
		J3	0,19	-0,02	0,54	1,95	0,46	0,81	0,55	-1,18	0,51
		J3	0,31	0,72	1,24	-0,52	0,56	-1,03	1,34	0,11	-0,14
	+H ₂ O ₂	J2	-0,50	-0,28	-2,03	2,50	0,60	1,91	1,50	1,49	0,14
		J2	1,18	1,17	-1,09	-1,67	-0,79	-1,50	0,36	1,76	-0,71
		J3	-0,47	0,42	-0,67	1,98	1,46	1,25	-0,34	1,20	0,88
		J3	0,12	0,73	1,87	-0,09	-0,08	-0,31	0,56	2,41	-0,27
Bion	-H ₂ O ₂	J2	-0,36	-0,09	1,78	3,27	-1,44	4,65	4,37	1,49	0,64
		J2	1,50	2,12	5,84	2,30	1,01	2,22	4,44	0,11	1,81
		J3	-1,36	-0,49	1,65	4,30	1,59	3,82	4,71	-0,34	1,24
		J3	-0,95	-0,13	4,27	1,21	0,74	2,13	4,05	1,09	0,36
	+H ₂ O ₂	J2	-0,87	-1,18	-0,39	5,25	1,78	4,75	5,08	1,98	0,93
		J2	1,57	1,44	2,22	1,04	0,26	3,69	2,97	-0,06	0,68
		J3	-1,81	0,16	2,35	6,40	2,38	3,03	6,33	-0,37	2,08
		J3	0,03	1,38	3,84	2,82	1,75	2,30	3,97	2,74	1,14
Rhodofix	-H ₂ O ₂	J2	1,79	2,28	1,63	0,93	-0,45	1,98	2,99	-1,09	1,76
		J3	0,60	1,89	3,86	1,57	0,54	2,53	4,13	-1,04	1,59
	+H ₂ O ₂	J2	1,71	1,74	1,84	0,13	-0,21	1,64	2,93	0,34	1,58
		J3	0,50	1,68	3,01	1,52	0,55	1,71	4,55	-0,20	1,18
Régalis	-H ₂ O ₂	J2	0,16	0,63	-0,16	1,72	0,11	2,12	0,35	1,25	1,09
		J2	1,83	2,13	0,41	-0,04	-0,22	0,76	1,87	0,39	1,56
		J3	0,22	0,67	0,57	2,90	1,42	1,79	1,90	-0,73	2,28
		J3	0,83	2,32	1,15	0,31	0,14	-0,20	2,15	-1,34	1,52
	+H ₂ O ₂	J2	0,14	0,67	-1,85	3,50	1,10	2,43	1,63	1,63	1,48
		J2	2,88	3,35	4,53	-0,92	-0,22	0,59	3,11	0,79	2,14
		J3	0,85	2,57	-0,43	3,49	2,97	2,62	2,12	-0,69	1,77
		J3	0,18	0,51	1,47	-0,29	0,09	-0,42	1,18	-3,31	-0,46
PRM12	-H ₂ O ₂	J2	0,08	0,23	1,59	0,23	-0,46	-0,18	0,59	0,53	0,48
		J3	3,78	4,60	5,67	1,41	0,62	0,57	4,12	1,15	1,88
	+H ₂ O ₂	J2	1,96	1,98	-0,58	-1,17	-1,18	-1,85	1,90	1,01	0,44
		J3	0,23	1,10	0,63	0,09	0,30	-1,62	1,42	-1,91	0,68
MeJA	-H ₂ O ₂	J2	2,97	2,92	1,28	1,49	0,00	2,34	2,29	-3,00	1,00
		J3	1,22	1,55	0,78	1,16	0,13	1,51	1,81	0,95	-0,15
	+H ₂ O ₂	J2	3,73	3,43	0,80	-0,38	-0,07	0,74	2,26	1,87	0,47
		J3	1,47	1,36	1,23	0,60	0,43	0,39	1,46	2,11	0,87
Deshydratation	J2	0,73	1,83	-1,22	0,38	-1,48	2,62	-0,41	-1,40	-2,02	
	J4	2,34	2,06	-0,69	1,55	-2,61	0,92	-0,86	0,00	-3,05	
	J7	1,45	2,08	-0,74	1,05	-2,70	2,51	-0,10	0,54	-1,37	
	J10	1,08	1,87	-0,14	1,28	-3,63	1,64	0,50	1,90	-1,55	

Traitements	Délai de prélèvement	CHS	DFR	PPO	HMG R	FPPS	Far	CSL	APOX	GST
PEG	J1	0,93	0,87	0,37	-1,18	-0,12	3,26	1,24	0,00	0,20
	J2	0,05	1,12	0,35	-0,87	0,29	0,96	1,18	2,38	-0,01
	J2	-0,67	0,78	1,76	1,66	-2,51	1,06	-0,15	-1,37	-0,73
	J3	0,64	2,42	-1,57	0,20	-0,79	1,45	2,23	1,31	-0,39
	J4	1,96	1,80	1,17	1,33	-3,95	-1,20	1,20	-0,35	-0,71
	J7	1,74	1,83	-2,02	-0,07	-4,15	0,18	0,75	0,68	-0,79
	J10	1,09	1,00	1,22	0,45	-4,63	-2,01	1,65	-1,06	-0,82
Paraquat	J1	-1,56	-0,74	0,67	2,85	1,02	2,76	2,29	0,00	1,99
	J2	-1,49	-1,14	6,27	1,20	0,15	2,30	4,42	2,01	1,83
	J3	-2,04	-2,09	4,63	-0,24	-1,83	1,85	5,43	1,48	0,80
H ₂ O ₂	J2	0,35	0,50	-1,99	2,70	1,94	2,37	0,53	0,41	-0,81
	J2	1,33	0,80	-0,71	-0,07	-1,18	-0,97	-0,02	0,38	-0,02
	J3	-0,51	-0,73	-1,75	3,13	1,96	0,51	-0,38	-1,38	0,33
	J3	-0,09	0,57	1,24	1,37	0,85	2,02	1,64	0,77	0,40
<i>E. amylovora</i>	6h	-2,67	-1,16	6,27	4,71	5,12	6,13	4,94	-2,33	4,10
	6h	-4,28	-4,32	6,18	2,86	2,64	4,46	3,90	0,61	2,53
	24h	-1,32	-0,16	7,60	3,71	2,52	3,58	5,20	-0,82	3,24
	24h	-2,85	-1,79	8,04	2,68	1,78	5,68	3,70	-2,17	3,43

Tableau 6

Expression relative des gènes de défense dans des feuilles de pommiers soumis à différents traitements (SDN potentiels, stress abiotiques, infection par *E. amylovora*)

5

Traitements	Délai de prélèvement	POX	CAD	CaIS	Pect	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACC O	EIN3	
Baba	-H ₂ O ₂	J2	0,44	-0,45	0,19	-0,04	0,41	-1,51	0,37	-0,80	0,10	-0,09
		J2	1,57	0,26	0,66	-1,38	0,08	-0,34	-0,61	0,56	-0,26	3,15
		J3	-1,16	0,71	0,00	-0,73	0,16	-1,33	-0,69	-0,29	0,00	-0,65
		J3	0,95	-0,30	0,35	1,66	-1,70	2,55	0,09	0,29	0,43	0,41
	+H ₂ O ₂	J2	2,20	-0,87	0,75	2,04	1,13	0,34	0,10	-0,44	1,14	0,60
		J2	2,28	-0,16	0,44	-1,76	-0,69	-1,71	-0,41	-0,16	2,13	1,94
		J3	1,41	-0,15	2,10	2,96	0,97	0,27	-0,62	1,52	0,64	1,69
		J3	3,22	-0,29	1,88	2,11	-0,58	-0,35	0,09	1,02	2,14	1,32
Bion	-H ₂ O ₂	J2	3,76	-0,36	1,31	2,63	3,21	1,67	-0,75	-1,13	1,28	-0,64
		J2	2,77	0,56	-0,27	-0,32	3,65	4,54	-1,00	-1,32	2,24	2,03
		J3	3,56	-0,30	0,49	1,61	3,26	2,22	-1,18	-0,57	1,36	0,05
		J3	4,65	0,34	0,89	0,99	2,50	4,79	0,00	-0,62	0,69	0,22
	+H ₂ O ₂	J2	4,75	-1,34	0,97	2,35	3,50	2,08	-1,78	-1,39	1,60	-0,09
		J2	1,76	0,28	0,06	0,50	2,74	3,47	0,31	-0,32	3,40	2,22
		J3	1,72	-1,08	0,94	1,89	4,09	1,77	-1,71	-1,46	1,78	-0,70
		J3	5,67	0,31	1,27	3,73	4,15	7,33	0,16	0,87	3,01	1,67

Traitement s	Délai de prélè veme nt	POX	CAD	CaIS	Pect	EDS1	WRK Y	LOX2	JAR	ACC O	EIN3	
Rhodofix	-H ₂ O ₂	J2	3,68	0,09	0,44	1,68	2,49	0,38	-0,39	-1,04	0,98	2,03
		J3	6,80	-0,10	0,51	2,97	3,04	4,50	-0,09	-1,54	2,42	-0,13
	+H ₂ O ₂	J2	4,84	0,15	0,90	-0,18	2,16	2,19	0,19	-0,60	2,68	1,42
		J3	5,52	-0,26	1,11	2,66	1,12	4,09	0,40	0,20	4,22	0,89
Régalis	-H ₂ O ₂	J2	2,92	0,63	0,39	3,00	2,14	1,84	-0,59	-0,14	0,93	1,52
		J2	2,94	0,63	-0,46	-0,30	1,43	0,52	-0,15	-0,10	1,81	1,56
		J3	1,50	0,82	0,19	1,63	3,43	-0,99	0,20	-0,66	0,66	-0,44
		J3	5,21	0,78	-0,07	2,72	1,49	1,08	0,25	-0,38	1,52	-0,17
	+H ₂ O ₂	J2	4,60	-0,54	0,17	3,65	1,40	-0,35	-1,07	-1,78	1,27	0,68
		J2	2,65	0,68	-0,72	-1,86	0,76	2,12	0,44	-0,64	2,81	0,91
		J3	2,10	-0,31	0,58	0,44	2,50	-0,96	0,10	-0,27	0,85	-1,09
		J3	1,28	-0,04	0,51	1,12	0,01	-0,02	0,89	-3,59	3,40	0,66
PRM12	-H ₂ O ₂	J2	0,56	0,67	0,78	0,29	0,34	-1,70	-0,39	-0,34	0,93	2,56
		J3	3,25	0,94	1,05	-0,90	-0,13	4,08	1,72	0,40	2,23	0,59
	+H ₂ O ₂	J2	3,59	-0,36	0,30	1,47	-0,50	-0,94	-0,24	-0,22	3,56	2,74
		J3	2,52	0,00	1,24	4,88	-0,32	1,27	0,13	1,03	4,56	2,32
MeJA	-H ₂ O ₂	J2	0,66	1,52	0,05	0,98	1,91	1,25	1,60	1,25	1,92	3,82
		J3	3,86	0,01	1,14	3,87	1,22	0,85	1,45	0,63	1,96	1,22
	+H ₂ O ₂	J2	2,84	0,70	0,48	-2,02	-0,17	-0,06	1,51	0,73	3,48	2,54
		J3	4,29	0,35	1,48	2,16	0,98	3,46	1,99	1,61	2,28	1,80
Deshydrat ation	J2	-0,03	-0,89	0,23	-1,95	-0,07	-1,80	1,19	0,30	0,32	-1,87	
	J4	0,00	-0,87	0,00	0,00	0,44	-2,58	1,07	0,00	0,71	0,00	
	J7	1,54	-0,48	-0,53	2,56	0,13	0,63	1,85	-0,46	0,03	-1,23	
	J10	2,44	-0,43	0,12	4,46	0,23	-0,39	2,06	0,04	1,74	0,91	
PEG	J1	0,00	0,59	0,00	0,00	0,24	-1,23	1,51	0,00	-1,96	0,00	
	J2	-1,33	0,72	0,24	2,18	0,46	0,70	2,48	1,06	0,69	0,02	
	J2	-1,07	-0,52	0,38	-1,23	-0,92	-0,10	2,19	-0,46	-0,56	-1,82	
	J3	-3,29	-0,31	-0,89	-0,98	0,96	3,41	0,41	-1,00	0,51	-0,36	
	J4	0,81	0,86	0,43	2,37	-1,62	-1,24	1,36	-1,43	-0,33	0,63	
	J7	0,00	0,06	0,86	2,38	-0,54	-2,30	1,96	-0,19	-0,36	-0,18	
	J10	-2,50	0,58	-0,08	0,56	-2,40	-1,11	1,00	-1,66	1,16	-0,07	
Paraquat	J1	0,00	0,04	0,00	0,00	0,83	4,01	-0,58	0,00	-1,33	0,00	
	J2	4,26	0,27	0,42	2,17	2,89	6,37	-0,54	-0,81	0,02	0,21	
	J3	-0,53	-0,51	0,01	-2,82	2,28	2,76	-2,37	-2,46	0,41	-0,11	
H ₂ O ₂	J2	1,07	-1,64	1,67	-0,44	1,42	-0,04	0,18	1,09	0,89	1,44	
	J2	1,06	0,29	0,27	-1,62	-0,36	-0,12	-0,45	-0,27	1,36	1,53	
	J3	-0,26	-0,72	-0,10	0,71	0,19	-2,26	0,16	-0,56	0,30	-0,26	
	J3	1,88	-0,54	0,93	1,65	2,08	4,02	0,42	0,43	0,84	0,41	
<i>E. amylovora</i>	6h	2,76	1,95	1,31	-1,27	1,36	6,02	-4,60	-3,83	1,66	5,00	
	6h	3,64	1,63	2,92	-0,60	2,03	8,29	-4,63	-0,19	1,37	6,02	
	24h	-0,79	1,81	0,09	-3,72	1,25	2,13	-3,50	-2,34	1,31	1,74	
	24h	1,12	2,46	-0,42	-5,98	0,91	2,51	-2,57	-5,31	1,11	0,97	

Essai 2 - Validation de la pertinence des gènes sélectionnés à partir de 10 SDN**Protocole :**

5 Les produits testés sont listés dans le tableau 7. Il s'agit de 10 candidats SDN, ainsi qu'un antibiotique (la Plantomycine).

Tableau 7

Produits testés	Matière active	Concentration testée*	Remarques
Aliette (BayerCropScience)	Fosétyl-Al	6 g/l	Fongicide, SDN
Amid-Thin (Nufarm)	1-Naphtalèneacétamide	0,6 g/l	Eclaircisseur analogue auxine
Bion (Syngenta)	Acibenzolar-S-methyl	0,4 g/l	Analogue SA, SDN
Iodus (Goëmar)	Laminarine	7,5 ml/l	SDN
Maxcel (Valent Biosciences)	6-benzyl adénine	7,5 ml/l	Eclaircisseur analogue cytokinine
PRM12 (BayerCropScience)	Ethéphon	3 ml/l	Eclaircisseur précurseur d'éthylène
Régalis (BASF)	Prohexadione-Ca	2,5 g/l	Régulateur de croissance analogue acide 2-oxoglutarique
Rhodofix (Nufarm)	α -Naphtyl acide acétique	1,5 g/l	Eclaircisseur analogue auxine
Stifénia (S.O.F.T.)	Extrait de graines de fénugrec	10 g/l	SDN
V-Plaask (Plaaskem)	Dérivés SA + fertilisant	10 ml/l	Fertilisant et SDN
Plantomycine	Streptomycine	0,56 g/l	Antibiotique

* Concentration en produit formulé

10 • *Pour l'analyse des défenses*

Les tests sont conduits en conditions semi-contrôlées en serre (23°C jour/17°C nuit, éclairage naturel, complément néon), sur semis de Pommier (issus de pépins de la variété Golden Delicious), en croissance active, au stade 3 à 6 feuilles.

15 Les plantes sont pulvérisées jusqu'à refus avec les produits candidats ou avec de l'eau (témoin négatif) à J0, au pulvérisateur à air comprimé.

La moitié de ces plantes est pulvérisée avec du peroxyde d'hydrogène (dilution au 200ème d'une solution à 30%) au pulvérisateur manuel à J1 (J0 + 1 jour) pour simuler une

attaque d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien (ceci permet de repérer un effet potentialisateur des défenses *versus* stimulateur direct, pour les produits testés).

Des prélèvements de disques foliaires (10 disques de 0,6 cm de diamètre sur 5 feuilles F1 poolées / prélèvement) sont effectués à J0 (semis non traités = calibrateur), puis à J1 (avant traitement au peroxyde d'hydrogène), et enfin à jour J2 (J0 + 2 jour) et J3 (J0 + 3 jour) sur les lots traités, ou non, au peroxyde d'hydrogène.

Les disques foliaires sont immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à extraction des ARN. Ces derniers sont rétrotranscrits en ADNc et les niveaux d'expression de gènes de défense sont suivis par qPCR (SYBR Green) à l'aide de l'outil selon l'invention.

Trois essais biologiques indépendants ont été réalisés pour l'ensemble des produits.

Les niveaux d'expression relative sont calculés avec la méthode du $\Delta\Delta Ct$: il s'agit d'expressions relatives par rapport au calibrateur (J0), ou par rapport aux témoins eau à chaque temps de prélèvement, normalisées par la moyenne géométrique des expressions relatives de 3 gènes de référence (TuA, actin, GAPDH). Ces expressions relatives sont transformées en \log_2 pour donner le même poids aux inductions et aux répressions de gènes.

• *Pour l'analyse du pouvoir de protection*

Ces mêmes produits ont été testés pour leur pouvoir de protection vis-à-vis du feu bactérien de la manière suivante.

Les essais ont été réalisés sur le même type de matériel végétal et dans des conditions de serre identiques que ci-dessus.

Les produits sont pulvérisés avec le même pulvérisateur que ci-dessus, 4 jours ou 4 heures avant inoculation artificielle par *E. amylovora* (parcelles de 3x10 semis par produit et par délai traitement-inoculation).

Le jour de l'inoculation, la plus jeune feuille développée (F1) de chaque semis (qu'il ait été traité 4 jours avant par les produits, ou qu'il s'apprête à recevoir un traitement dit « -4h ») est blessée à l'aide d'un scalpel (2 coupures parallèles au 1/3 inférieur de la feuille, et perpendiculaires à la nervure principale).

Les traitements « -4h » sont alors réalisés.

Quatre heures après traitement, une suspension bactérienne de la souche CFBP1430 d'*E. amylovora*, préparée dans de l'eau stérile à 10^8 cfu/mL, est inoculée par pulvérisation (au pulvérisateur à pression) sur l'ensemble des plantes traitées 4 jours ou 4 heures avant, et blessées 4 heures avant.

La notation des symptômes, c'est-à-dire présence d'une nécrose ayant évolué sur tige à partir de la feuille blessée, est réalisée 3 semaines après inoculation. Le pourcentage de plantes infectées est calculé dans chaque parcelle de 10 plantes et rapporté à la moyenne des pourcentages d'infection obtenus pour les 3 parcelles témoins « eau » du même essai (infection relative). Les distributions des pourcentages d'infection relative obtenus (intra et inter-

expériences) sont représentées par des boîtes à moustaches de Tuckey : la médiane est représentée par le large trait noir au centre de la boîte et la moyenne par le carré ; les encoches représentent les intervalles de confiance de la médiane (P=0.05).

Au moins deux essais indépendants ont été réalisés sur l'ensemble des produits.

5

Résultats :

• *Analyse des défenses*

Les résultats d'expression moyennée des 28 gènes cibles sont détaillés dans les tableaux 8 et 9 ci-après ; ces résultats sont répartis dans plusieurs tableaux, uniquement dans un souci de présentation.

Les résultats d'expression des gènes issus de l'outil selon l'invention (Tableaux 8 et 9) révèlent 4 produits (Bion, Iodus, Régalis, Rhodofix) capables d'activer des défenses de manière répétable sur les 3 répétitions biologiques indépendantes.

Les inductions concernent un jeu assez proche de gènes dans les feuilles de Pommier avec quelques différences cependant.

a) Bion est le produit qui active le plus de gènes, de manière la plus intense (certains gènes sont régulièrement exprimés 2^{10} fois plus dans les tissus traités au Bion que dans les tissus témoins) et de façon très reproductible. Les gènes de la voie SA sont particulièrement induits, et cette forte induction est corrélée avec une répression des gènes de la voie JA, ce qui est cohérent avec l'antagonisme voie SA/voie JA décrit dans la littérature.

b) Iodus, Régalis et Rhodofix n'activent, de manière significative, qu'une partie des gènes induits par le Bion, ou de manière moins constante. Par exemple, PR1, PR5 ou PPO sont 3 gènes fortement activés par le Bion et, pas ou peu par ces 3 produits.

c) Régalis montre un effet potentialisateur car les inductions de gènes se manifestent surtout après le traitement au peroxyde d'hydrogène (particulièrement visible pour le gène PECT).

d) Les 3 autres produits qui revendiquent une action SDN, à savoir Aliette, Stifenia et V-Plaask, ainsi que les 3 autres éclaircisseurs, à savoir Amid Thin, Maxcel et PRM12, ou encore le produit biocide Plantomycine, ne provoquent pas d'induction reproductible et significative.

• *Analyse de la protection*

Parmi les 11 produits testés, seuls trois manifestent une efficacité de protection vis-à-vis du feu bactérien lorsqu'ils sont pulvérisés 4 jours avant inoculation (conditions pour révéler un effet stimulateur) : il s'agit du Bion, de Régalis et de Rhodofix qui réduisent significativement les pourcentages d'infection des semis (Figure 1A).

Les produits qui n'induisent aucun des gènes de défense présents sur l'outil, ainsi que Iodus qui est capable d'induire quelques défenses, n'ont pas d'efficacité de protection lorsqu'ils sont appliqués 4 jours avant inoculation.

Pulvérisés quelques heures avant inoculation, Bion conserve une efficacité très significative ; et Régalis présente toujours une efficacité qui reste également significative, quoique moins élevée (Figure 1B).

5 Ces efficacités n'atteignent cependant pas celle obtenue avec la Plantomycine, biocide vis-à-vis d' *E. amylovora*.

Aucun autre produit ne diminue, de manière significative et reproductible, les pourcentages d'infection des semis.

• *Conclusion*

10 Au vu de ces résultats, l'outil selon l'invention permet d'éliminer la majorité des produits candidats SDN qui s'avèrent sans potentiel de protection de semis de Pommier vis-à-vis du feu bactérien, c'est-à-dire Aliette, Amid Thin, Maxcel, PRM12, Stifenia, V-Plaask.

Parmi les 4 produits retenus par le crible (Bion, Iodus, Régalis, Rhodofix), seul Iodus ne montre finalement pas d'efficacité de protection sur semis vis-à-vis du feu bactérien.

15 L'outil selon l'invention est donc utile pour sélectionner les produits ayant un potentiel de protection (tout au moins vis-à-vis du feu bactérien), et qui méritent d'être retenus pour expérimentation.

Tableau 8

Traitement	Délai	PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
Aliette	J1	-0,97	0,16	0,31	0,50	-0,28	0,10	2,13	0,37	-0,09	-0,01	-1,01	2,64	0,18	-0,40
	J2	-2,12	-2,17	0,92	-2,16	0,87	-0,20	0,46	-0,25	0,21	-0,03	0,22	-1,07	0,63	0,12
	J3	-0,55	0,49	0,48	0,26	-0,02	-1,27	-0,41	-1,17	-1,32	-1,55	-0,92	1,00	0,41	-0,18
	J2 + H ₂ O ₂	-0,68	1,05	3,91	-0,94	3,17	0,81	0,00	-0,95	-0,75	-0,70	-0,43	-0,09	0,54	0,00
	J3 + H ₂ O ₂	0,04	3,21	0,70	1,30	0,24	-0,01	0,53	-1,26	-1,58	-1,36	-1,06	1,64	0,44	-0,10
Amid Thin	J1	0,81	0,80	0,86	-0,57	0,39	1,50	-0,39	0,09	0,23	0,23	0,45	1,05	0,52	-0,39
	J2	-0,13	-0,73	0,65	-0,81	0,40	-0,32	0,52	0,06	0,74	0,54	0,53	-0,45	-0,05	0,02
	J3	-0,58	0,44	-0,37	0,21	-0,15	0,33	0,04	-0,23	-0,05	-0,56	-0,23	0,95	0,50	0,59
	J2 + H ₂ O ₂	0,37	2,33	3,22	-0,07	2,39	1,78	1,66	-0,16	-0,39	-0,19	-0,08	0,38	-0,17	0,45
	J3 + H ₂ O ₂	0,16	2,30	1,21	0,49	1,06	1,04	0,01	-1,17	-1,52	-1,73	-0,64	0,10	0,42	0,43
Bion	J1	1,74	6,30	5,80	3,73	2,51	1,06	-0,62	-0,17	-1,79	-1,64	-1,51	1,19	2,18	0,93
	J2	3,47	8,78	9,62	4,12	4,82	3,99	-0,89	2,22	0,97	0,78	1,10	3,65	3,31	1,74
	J3	6,18	11,20	9,96	4,70	5,29	7,61	4,24	1,11	0,09	0,26	0,30	5,55	1,64	1,02
	J2 + H ₂ O ₂	3,58	9,23	9,75	4,07	5,72	4,19	1,06	2,06	-0,17	-0,16	0,04	4,74	3,84	1,42
	J3 + H ₂ O ₂	6,07	11,05	8,99	4,46	4,97	6,87	2,40	0,78	0,53	0,04	0,20	4,32	2,23	0,75
Iodus	J1	1,67	6,04	6,91	1,24	3,37	4,09	1,90	0,50	-1,37	-1,03	-0,62	2,55	2,20	1,55
	J2	4,53	4,74	6,88	3,15	5,46	6,92	1,75	1,13	1,04	0,14	1,61	1,81	2,76	-0,02
	J3	3,30	3,22	4,64	1,56	2,43	1,26	0,08	-2,39	0,07	-0,42	-0,03	2,48	0,48	-0,25
	J2 + H ₂ O ₂	3,93	4,28	6,98	3,35	5,28	6,86	1,51	0,11	0,86	-0,63	1,10	0,89	2,71	0,05
	J3 + H ₂ O ₂	3,54	3,31	4,74	2,02	2,65	1,76	0,44	0,69	0,53	-0,20	0,54	2,39	0,75	-0,19
Maxcel	J1	0,45	-0,87	0,99	-0,20	0,10	0,77	-0,01	-0,01	0,20	-0,17	0,59	0,26	0,11	-0,59
	J2	-0,20	-1,11	0,18	-0,21	0,34	1,03	0,26	-0,31	0,65	0,07	0,55	-1,06	0,17	-0,06
	J3	0,75	-0,27	-0,01	0,08	-0,71	-2,12	1,00	-0,47	-1,14	-0,75	-0,21	0,61	0,04	0,43
	J2 + H ₂ O ₂	0,77	1,23	2,92	-0,46	2,81	0,88	0,32	-0,29	0,44	-0,50	0,59	-1,08	0,05	-0,03
	J3 + H ₂ O ₂	0,64	2,02	0,30	0,89	1,15	-0,49	-0,14	-0,42	-0,85	-0,77	-0,10	0,09	0,67	0,47
PRM12	J1	-0,79	0,01	2,58	-0,61	0,92	1,82	-0,97	1,06	0,92	0,37	1,13	0,62	0,98	-0,70
	J2	0,00	-0,31	0,66	-1,59	0,74	-1,04	-0,64	-0,44	0,32	-0,04	0,00	-0,22	0,36	-0,10
	J3	-0,49	0,10	0,11	0,20	-0,76	-1,25	1,16	-0,60	-0,91	-0,80	-0,52	1,15	-0,09	-0,09
	J2 + H ₂ O ₂	1,17	2,72	2,68	-0,41	2,77	1,47	1,75	-0,01	0,86	0,33	0,92	1,03	0,49	0,33
	J3 + H ₂ O ₂	-0,35	2,21	0,64	0,49	0,68	-1,21	0,17	-1,18	-1,36	-1,48	-0,70	0,15	0,19	-0,14

Traitement	Délai	PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMGR	FPPS
Regalis	J1	-0,24	0,79	3,93	-0,05	1,52	1,62	1,27	0,31	1,11	0,78	0,47	3,48	0,66	0,16
	J2	0,28	2,27	4,29	1,65	2,45	1,75	1,43	0,01	1,77	0,82	1,02	0,32	0,20	0,41
	J3	0,86	4,69	3,25	1,13	2,96	1,70	-0,04	0,63	1,54	0,97	1,04	0,38	0,64	0,17
	J2 + H ₂ O ₂	1,19	5,46	7,22	2,55	4,21	4,20	2,33	0,69	1,43	0,84	1,23	2,70	1,44	0,47
	J3 + H ₂ O ₂	2,87	6,25	6,17	2,94	4,20	3,20	1,13	1,29	1,52	1,25	1,78	2,35	1,08	0,45
Rhodofix	J1	1,46	4,99	6,65	0,83	3,69	6,53	0,88	0,39	0,00	0,15	0,64	2,77	1,89	0,76
	J2	1,27	6,82	7,40	3,26	4,33	4,18	-0,26	1,21	1,44	1,51	1,03	0,35	1,70	0,56
	J3	0,34	4,00	2,56	1,51	0,57	0,42	0,68	0,09	-0,17	-0,11	0,05	-0,12	-0,23	-0,08
	J2 + H ₂ O ₂	0,37	6,46	6,92	2,61	4,04	4,83	-0,44	-0,01	-0,10	0,06	0,01	0,48	1,25	0,36
	J3 + H ₂ O ₂	2,19	4,95	4,82	2,02	2,71	1,34	0,06	-0,01	-0,24	-0,45	0,82	0,45	1,45	0,62
Stifenia	J1	-0,80	0,14	-0,99	0,46	-0,54	-0,75	-1,84	-1,12	-1,13	-1,00	-1,59	-0,82	-0,40	-0,25
	J2	0,72	1,28	1,56	3,09	2,33	1,12	1,19	0,31	0,88	0,68	0,63	-0,08	0,05	0,12
	J3	0,61	0,24	0,47	0,11	1,11	1,84	1,19	0,39	0,30	0,64	1,14	-0,50	0,57	1,29
	J2 + H ₂ O ₂	1,32	1,72	4,01	2,55	5,59	2,16	0,97	0,53	0,71	0,03	0,58	0,15	0,99	-0,13
	J3 + H ₂ O ₂	1,31	-0,02	0,00	-0,07	1,19	0,11	-0,26	-0,70	-0,13	-0,39	0,23	0,81	0,58	0,22
Plantomyc.	J1	1,23	1,05	1,51	-0,19	0,21	0,35	0,43	-0,48	-1,42	-0,99	-1,04	1,91	0,02	0,01
	J2	-1,62	-1,16	-0,33	-0,45	0,03	0,18	-0,94	-1,14	-0,79	-1,28	-1,50	-0,61	0,16	-0,50
	J3	1,39	2,59	1,35	1,12	0,27	0,14	1,93	-0,17	-1,00	-0,25	-0,96	1,13	-0,27	0,07
	J2 + H ₂ O ₂	1,54	2,96	4,03	0,07	3,00	1,80	0,37	-0,28	-0,07	0,07	0,04	1,38	0,89	0,09
	J3 + H ₂ O ₂	2,03	3,31	2,19	0,60	1,14	-0,06	0,58	-0,88	-0,63	-0,44	-0,68	1,75	0,30	-0,34
Vplaask	J1	-0,66	-0,20	0,25	1,60	0,17	-0,05	0,83	0,24	0,52	0,35	-0,20	0,88	-1,60	-0,43
	J2	0,76	-0,15	-0,98	1,53	2,50	2,37	1,02	-3,41	-0,25	-1,44	-0,33	-0,78	0,77	-2,23
	J3	0,40	-0,45	0,38	0,57	0,16	-1,44	0,23	-0,20	-0,61	-1,29	-0,78	0,35	0,28	0,13
	J2 + H ₂ O ₂	0,37	1,11	1,39	1,53	2,83	2,22	2,54	-1,33	0,27	-1,03	0,64	0,79	0,84	0,47
	J3 + H ₂ O ₂	1,43	0,48	0,24	1,25	0,30	-1,88	1,05	-0,79	-1,39	-1,61	-1,00	1,26	0,34	0,57
H₂O₂	J2 + H ₂ O ₂	0,85	3,69	3,89	0,91	2,12	1,32	-0,26	-0,56	-0,63	-0,80	-0,65	1,20	1,05	0,06
	J3 + H ₂ O ₂	1,41	4,05	2,59	1,73	1,73	3,29	1,57	-0,57	-0,49	-0,75	-0,36	0,71	0,14	0,08

Tableau 9

Traitement	Délai	FAR	CSL	APO X	GST	POX	CAD	CaIS	PECT	EDS1 Y	WRK	LOX2 JAR	ACC O	EIN3 O	
Aliette	J1	-0,90	-0,16	-0,29	-0,23	0,99	0,02	-0,22	-0,32	0,09	-0,04	0,39	-0,40	-0,23	-0,35
	J2	-1,62	-0,21	0,09	-0,06	-0,91	-0,12	0,06	-0,89	0,44	1,18	0,23	-0,25	-0,08	0,07
	J3	0,78	-0,19	-0,29	0,16	-0,23	-0,05	-0,09	-0,24	-0,36	-1,39	0,05	-0,08	-0,13	0,54
	J2 + H ₂ O ₂	-1,25	0,23	0,12	0,73	2,39	0,06	0,24	0,61	1,20	0,51	0,21	-0,45	0,44	0,45
	J3 + H ₂ O ₂	1,28	0,24	0,12	0,42	2,08	0,08	0,25	0,24	-0,21	-0,30	0,29	0,15	-0,09	0,69
Amid Thin	J1	0,06	0,17	-0,40	0,51	0,91	0,31	-0,14	1,21	0,18	0,02	0,45	0,11	0,57	0,71
	J2	-0,54	0,16	-0,42	0,46	0,01	0,37	0,09	0,11	1,03	-0,33	0,38	-0,09	0,44	0,59
	J3	-0,30	-0,14	-0,14	0,54	0,37	0,05	0,18	0,37	0,32	0,38	0,19	0,13	0,36	0,13
	J2 + H ₂ O ₂	0,20	0,51	0,13	0,88	1,16	0,41	0,71	1,62	1,74	1,53	-0,09	0,42	0,89	0,35
	J3 + H ₂ O ₂	0,96	-0,39	-0,47	0,44	0,77	-0,15	0,33	0,03	0,27	-0,45	-0,40	-0,28	0,04	-0,27
Bion	J1	4,20	1,74	-0,06	2,35	1,66	0,51	-0,04	0,17	3,21	2,30	-0,67	-1,10	0,89	0,52
	J2	3,26	5,50	0,42	2,08	3,27	0,14	-0,17	1,03	4,14	5,54	-0,36	-0,82	1,26	1,02
	J3	2,54	7,15	0,62	1,86	3,47	0,38	0,49	2,26	4,09	4,99	-1,25	-0,84	1,11	0,30
	J2 + H ₂ O ₂	2,36	6,70	0,49	1,99	3,67	0,25	-0,18	1,10	4,65	5,61	-1,52	-2,01	1,12	0,64
	J3 + H ₂ O ₂	2,02	6,54	0,60	1,46	4,19	-0,02	0,16	2,07	4,22	5,04	-1,34	-1,06	0,98	-0,06
Iodus	J1	2,58	3,78	0,13	1,75	1,19	-0,43	-0,15	0,16	0,74	1,90	-0,34	-0,05	0,91	0,03
	J2	2,45	4,08	0,36	2,07	0,94	0,65	0,50	4,70	3,14	2,68	0,68	0,49	2,52	1,14
	J3	2,23	2,33	0,66	0,98	2,57	0,84	0,78	1,97	2,63	2,16	0,33	0,24	2,94	0,82
	J2 + H ₂ O ₂	3,05	3,40	-0,08	1,90	1,46	-0,19	0,71	4,55	1,33	2,11	0,34	1,30	2,10	0,87
	J3 + H ₂ O ₂	1,32	3,15	-0,32	1,91	2,73	0,12	0,42	1,21	2,05	2,33	-0,25	0,37	1,23	0,11
Maxcel	J1	-0,73	-0,17	-0,17	-0,23	-0,07	-0,46	-0,39	-0,23	0,11	-0,51	-0,20	-0,42	-0,19	0,10
	J2	-0,83	0,66	-0,60	0,56	-0,39	0,45	0,45	0,14	1,12	-0,11	0,29	0,00	0,52	0,93
	J3	0,15	-0,35	0,07	-0,04	0,01	-0,01	0,50	-0,19	0,22	-0,64	0,02	0,25	-0,02	-0,23
	J2 + H ₂ O ₂	-0,26	1,01	-0,07	0,79	1,34	0,51	0,11	0,12	2,25	1,34	-0,01	-0,18	0,54	0,95
	J3 + H ₂ O ₂	0,18	0,17	0,13	0,52	1,45	-0,13	0,36	0,45	1,17	0,50	0,21	0,21	0,44	0,52
PRM12	J1	0,48	-0,03	-0,70	0,22	-0,12	0,24	-0,23	0,80	0,50	-0,21	0,06	-0,90	0,40	1,61
	J2	-1,41	0,27	-0,66	0,47	-0,19	0,39	0,59	0,78	0,94	-0,36	0,02	-0,50	0,63	1,41
	J3	-0,43	0,02	-0,06	0,55	0,34	-0,03	0,70	0,73	-0,09	0,07	-0,38	-0,10	0,35	-0,05
	J2 + H ₂ O ₂	0,42	1,71	0,39	0,86	1,42	0,39	0,65	2,22	0,81	1,83	-0,03	0,10	1,11	1,72
	J3 + H ₂ O ₂	-0,40	-0,28	-0,27	0,27	0,73	-0,24	0,15	0,19	0,08	0,25	0,13	0,03	0,18	0,03

Traitement	Délai	FAR	CSL	APO X	GST	POX	CAD	CaIS	PECT	EDS1 Y	WRK	LOX2	JAR	ACC O	EIN3
Regalis	J1	1,83	0,89	-0,07	1,26	0,86	0,40	-0,01	-0,44	0,77	2,10	-0,07	-0,40	0,31	0,31
	J2	2,15	1,87	-0,06	1,79	1,80	0,68	0,14	0,73	1,60	0,42	0,03	-0,14	0,66	0,06
	J3	2,06	1,16	0,24	1,45	2,91	0,43	0,10	0,73	1,99	1,66	0,13	-0,03	0,53	-0,10
	J2 + H ₂ O ₂	3,72	3,19	-0,08	2,61	3,32	0,41	0,21	2,30	2,78	2,14	-0,08	-0,13	1,25	0,48
	J3 + H ₂ O ₂	2,81	2,81	0,41	2,12	4,25	0,75	0,41	2,58	2,46	3,33	0,24	0,02	1,21	0,62
Rhodofix	J1	3,09	0,90	-0,27	2,34	-0,11	-0,01	0,81	2,72	2,76	1,47	0,08	-0,69	2,01	0,91
	J2	3,18	2,97	-0,57	2,02	0,86	0,73	1,24	3,50	4,17	0,84	0,86	-0,31	1,79	1,59
	J3	1,51	1,21	0,08	1,01	1,74	0,50	1,07	3,01	0,91	-0,58	0,62	0,39	0,79	0,81
	J2 + H ₂ O ₂	3,16	2,41	-0,55	1,77	1,14	0,21	0,73	2,89	3,61	0,45	0,09	-0,87	1,32	0,83
	J3 + H ₂ O ₂	1,32	2,97	-0,08	1,11	0,80	0,18	0,67	2,21	2,30	0,87	0,08	-0,57	0,98	-0,17
Stifenia	J1	0,15	-0,85	-0,64	-0,44	-0,32	-0,42	-0,71	-1,08	-0,32	0,33	-0,48	-0,07	-0,12	-0,42
	J2	0,62	0,95	0,20	0,78	0,18	0,15	0,48	1,82	1,20	0,69	0,66	0,54	1,91	0,69
	J3	0,01	0,71	0,49	7,33	0,76	0,05	0,68	2,06	2,83	0,43	-0,16	1,47	5,54	0,88
	J2 + H ₂ O ₂	1,45	1,07	-0,71	0,84	0,65	0,48	0,31	3,30	1,94	1,14	-0,03	0,51	-0,33	1,06
	J3 + H ₂ O ₂	0,48	-0,29	0,08	7,24	0,89	0,05	0,40	1,93	2,78	0,65	-0,58	1,31	4,23	0,84
Plantomyc.	J1	-0,03	-0,59	-0,02	-0,03	1,37	-0,09	-0,08	0,21	0,14	1,36	0,12	0,27	0,29	0,00
	J2	-1,10	-0,96	-0,68	-0,06	-0,72	-0,15	-0,07	-0,57	-0,02	-1,10	-0,24	-0,62	-0,15	0,20
	J3	0,53	0,65	0,39	-0,01	0,80	0,10	0,02	0,18	-0,14	1,00	-0,16	0,24	0,14	0,05
	J2 + H ₂ O ₂	0,28	1,46	-0,37	0,65	3,03	-0,04	-0,01	1,06	0,99	1,47	-0,01	-0,27	0,47	0,55
	J3 + H ₂ O ₂	0,49	0,61	-0,17	0,25	2,60	0,05	-0,05	0,69	0,29	0,11	0,00	-0,12	0,21	0,36
Vplaask	J1	-0,49	0,62	-0,06	-0,40	0,11	-0,55	-0,31	-0,40	-0,39	-0,53	-0,43	-0,12	0,42	-0,31
	J2	-0,42	-0,54	-0,18	1,32	0,32	0,58	0,54	3,05	0,81	1,01	0,03	0,38	1,60	1,12
	J3	0,26	0,49	-0,47	3,32	0,75	-0,02	0,74	-0,16	0,95	0,56	-0,21	0,46	1,95	0,36
	J2 + H ₂ O ₂	-0,44	0,66	-0,68	0,92	0,96	0,37	0,56	2,96	0,95	0,43	0,02	0,29	1,88	1,04
	J3 + H ₂ O ₂	0,23	0,25	-0,21	3,31	2,25	0,07	0,78	0,74	0,05	1,54	-0,04	0,85	2,89	0,75
H202	J2 + H ₂ O ₂	1,07	2,28	-0,37	0,21	2,12	-0,32	-0,31	0,01	1,12	1,42	-0,39	-0,62	0,60	-0,20
	J3 + H ₂ O ₂	0,12	1,32	0,36	0,30	1,61	0,30	0,04	1,53	1,44	1,27	-0,03	0,09	0,37	0,33

Essai 3 : Vérification de la fiabilité de l'outil sur des plantes soumises à 3 conditions de stress : lumineux, thermique, hydrique

Protocole :

5

• *Stress lumineux*

Des semis de Golden Delicious (similaires à ceux de l'essai 2) sont déplacés (J0) de la serre d'élevage vers diverses serres, chambres climatiques ou armoires climatiques, possédant des éclairages qualitativement et quantitativement différents (Tableau 10) avec une photopériode de 16h jour/8h nuit en cas d'éclairage artificiel et une thermopériode de 23°C jour/17°C nuit.

Tableau 10 – Conditions d'éclairage testées

N° condition	Lieu	Type d'éclairage	Contrôle température	Humidité
Condition 1	Serre	Naturel + néon	Ouvrants	Ambiante
Condition 2	Chambre	HPS + MH	Climatiseur	Contrôlée
Condition 3	Chambre	MH	Climatiseur	Ambiante
Condition 4	Chambre	HPIT	Climatiseur	Contrôlée
Condition 5	Chambre	Néon	Climatiseur	Contrôlée
Condition 6	Serre	Naturel + HPS	Ventilateur extracteur	Ambiante
Condition 7	Serre	Naturel + HPS	Ventilateur extracteur	Ambiante
Condition 8	Serre	Naturel + néon	Ventilateur extracteur + cooling	Ambiante
Condition 9	Armoire	Néon	Climatiseur	Ambiante
Condition 10	Armoire	Néon	Climatiseur	Contrôlée

15 Ils y subissent une acclimatation de 24h puis sont pulvérisés jusqu'à refus au pulvérisateur manuel avec du Bion (0,4 g/l) ou de l'eau (J1).

Des prélèvements (méthodologie identique à celle de l'essai 2) sont effectués à J0 avant déplacement (3 répétitions de 10 disques), puis à J1 avant traitement (3 répétitions de 10 disques) puis à J3 et J4 sur les lots traités (1 répétition de 10 disques/traitement/condition).

20 Les échantillons sont extraits et analysés à l'aide de l'outil selon l'invention de manière identique à celle de l'essai 2. Cette expérience a été réalisée une fois.

• *Stress thermique*

25 Des semis de Golden Delicious (similaires à ceux de l'essai 2) sont déplacés (J0) de la serre d'élevage vers 2 armoires climatiques réglées sur le même régime de photopériode (16h

jour/8h nuit) mais sur deux régimes différents de thermopériode (23°C jour/17°C nuit ou 35°C jour/17°C nuit).

Ils y subissent une acclimatation de 24h puis sont pulvérisés jusqu'à refus au pulvérisateur manuel avec du Bion (0,4 g/l) ou de l'eau (J1).

5 Des prélèvements (méthodologie identique à celle de l'essai 2) sont effectués à J1 avant traitement puis à J4 sur les lots traités (1 répétition de 10 disques/traitement/condition de température/date de prélèvement).

Les échantillons sont extraits et analysés à l'aide de l'outil selon l'invention de manière identique à celle de l'essai 2. Deux répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées.

10

• *Stress hydrique*

Des semis de Golden Delicious (similaires à ceux de l'essai 2) sont déplacés en serre d'expérimentation (J-1) et disposés en 3 lots.

15 Un lot subit immédiatement deux arrosages successifs au PEG6000 à 36% (submersion, attente du ressuyage, puis nouvelle submersion) (PEG à J-1).

Après une acclimatation de 24h de l'ensemble des semis, un 2ème lot est également traité au PEG6000 de façon identique que précédemment (PEG à J0).

L'ensemble des lots est ensuite pulvérisé jusqu'à refus au pulvérisateur manuel pour moitié au Bion (0,4 g/l) et pour moitié à l'eau.

20

Des prélèvements (méthodologie identique à celle de l'essai 2) sont effectués à J0 sur le lot non traité au PEG et avant traitement Bion ou eau, puis à J2 et J3 sur l'ensemble des lots (1 répétition de 10 disques/traitement/condition hydrique/date de prélèvement).

Les échantillons sont extraits et analysés à l'aide de l'outil selon l'invention de manière identique à celle de l'essai 2. Cette expérience a été réalisée une fois.

25

Résultats :

• *Stress lumineux*

30 Les résultats d'expression des 28 gènes cibles sont détaillés ci-après dans les tableaux 11 et 12 ; ces résultats sont répartis dans plusieurs tableaux, uniquement dans un souci de présentation.

Dans ces tableaux, les lignes correspondent respectivement :

- « Non traité » = modulation observées 24h (J1) après déplacement de la serre d'élevage ;

35

- « Eau » et « Bion » = modulation observées 48 et 72 heures après traitement, soit 3 et 4 jours après déplacement de la serre d'élevage (J3 et J4), moyennée, dans les feuilles de semis pulvérisés au Bion ou à l'eau, respectivement.

L'observation des profils d'induction des semis après 24h d'acclimatation dans les différentes conditions d'éclairage (tableaux 11 et 12) montre une corrélation entre puissance (et spectre) de l'éclairage d'appoint et induction des gènes de la voie des phénylpropanoïdes.

5 L'analyse des profils après traitement des semis au Bion, ou à l'eau, révèle que les conditions d'éclairage les plus stressantes ne permettent pas de mettre en évidence un fort pouvoir inducteur du Bion notamment au niveau des protéines PR (Tableau 11), ce qui n'est pas le cas des conditions moins stressantes.

10 Quelques gènes sont cependant moins sensibles aux conditions d'éclairage que ceux codant certaines protéines PR ou des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes et permettent de mettre en évidence l'effet stimulateur du Bion dans la majorité des conditions : il s'agit de PR5, FAR et EDS1.

• *Stress thermique*

15 Les résultats moyennés d'expression des 28 gènes cibles sont détaillés dans les tableaux 13 et 14 ; ces résultats sont répartis dans plusieurs tableaux, uniquement dans un souci de présentation.

20 Pour ces tableaux, la légende est la suivante : T° normales = 23°C jour / 17°C nuit ; T° normales puis stressantes après traitement = 23°C jour / 17°C nuit pendant 24h, puis 35°C jour / 17°C nuit ; T° stressantes = 35°C jour / 17°C nuit ; T° stressantes puis normales après traitement = 35°C jour / 17°C nuit pendant 24h puis 23°C jour / 17°C nuit.

Des conditions de stress thermiques (35°C) sont capables d'activer fortement certains gènes de l'outil selon l'invention, en particulier plusieurs protéines PR, dans les semis témoins (traités à l'eau) lorsque le stress est maintenu tout au long de l'expérimentation (4 jours), ou appliqué juste après pulvérisation de l'eau (Tableaux 13 et 14).

25 Cette induction est corrélée à une forte répression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (excepté PPO).

Ces effets d'induction/répression sont transitoires dès lors que le stress est interrompu, puisqu'ils ne sont plus observés dans les semis témoins stressés 24h puis remis en conditions « normales ».

30 L'induction de certaines protéines PR provoquée par le stress thermique appliqué jusqu'à la date de prélèvement masque les capacités du Bion à induire les protéines PR (Tableau 13).

35 Néanmoins d'autres gènes de l'outil permettent de révéler l'effet du Bion, même dans ces conditions stressantes, car faiblement induits par le stress thermique à lui seul (CSL, POX, WRKY).

Enfin un stress thermique transitoire appliqué quelques heures avant traitement au Bion ne gêne pas la mise en évidence de l'effet inducteur de ce produit.

- *Stress hydrique*

Les résultats d'expression des 28 gènes cibles sont détaillés dans les tableaux 15 et 16 ; les résultats sont répartis dans plusieurs tableaux, uniquement dans un souci de présentation.

5 Dans les semis de Pommier, le stress hydrique tel qu'il a été appliqué (PEG) n'induit pas à lui seul les gènes de l'outil (Tableaux 15 et 16) : on n'observe pas de nettes différences entre les profils d'expression obtenus dans les 3 lots de plantes, stressées ou non, et pulvérisées à l'eau. De plus, il ne semble pas perturber l'effet inducteur du Bion, qui est révélé dans les 3 conditions.

10

- *Conclusion*

Ces expériences démontrent l'intérêt d'étudier plusieurs groupes de gènes de défenses, voire plusieurs gènes à l'intérieur de chaque groupe, pour révéler l'effet stimulateur d'un SDN candidat.

15 En effet, des conditions environnementales un peu stressantes (fort éclairage et température élevée) peuvent induire par elles-mêmes certains gènes de défense présents sur l'outil selon l'invention et masquer les effets des SDN.

20 Pour une utilisation optimale de l'outil dans un objectif de criblage de produits candidats, il est cependant conseillé de réaliser les expériences dans des conditions d'éclairage artificiel modéré et dans des conditions thermiques les plus contrôlées possibles. Un stress hydrique, dans la limite du raisonnable bien-sûr, ne devrait pas perturber l'utilisation de l'outil.

Tableau 11

		PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HM GR	FPPS
C1=Serre 1 d'élevage	Non traité	0,17	-0,11	-0,53	-0,59	0,28	-0,13	-0,49	0,04	0,07	-0,11	-0,17	-0,58	0,27	-0,12
C2=Chambre climatique 1 (éclairage HPS + MH)	Non traité	-0,62	-0,18	-1,14	-1,98	1,73	-1,02	-0,96	6,72	6,96	6,58	6,30	-1,08	-1,22	-2,25
	Eau	-1,00	-0,23	-2,57	1,46	2,22	-1,56	0,03	5,84	5,52	5,44	4,28	0,53	0,02	-1,91
	Bion	0,37	0,99	-0,53	5,11	3,70	-0,26	-0,13	5,90	5,78	5,42	4,33	0,18	0,92	-2,06
C3=Chambre climatique 2 (éclairage MH)	Non traité	-0,20	0,40	-0,90	-0,32	2,30	-0,19	-0,24	5,48	5,27	5,18	4,75	0,11	-0,66	-0,96
	Eau	-0,44	3,52	-0,39	3,06	2,68	-1,02	-0,11	4,83	3,94	4,34	3,39	-0,59	0,19	0,06
	Bion	0,38	1,95	-0,44	5,30	4,83	-1,07	-1,09	4,80	4,33	4,25	3,56	0,43	1,06	-0,99
C4=Chambre climatique 3 (éclairage naturel + HPIT)	Non traité	-0,30	0,10	-1,32	-0,80	0,16	-0,71	-0,40	5,67	5,18	5,04	4,13	-0,65	-0,74	-1,87
	Eau	-0,21	-0,95	-1,15	2,06	1,72	-0,92	0,34	3,05	3,73	3,56	2,31	0,14	-0,25	-0,05
	Bion	2,98	5,12	4,90	6,72	6,05	0,30	2,61	3,73	3,16	3,57	2,36	3,02	1,91	0,37
C5=Chambre climatique 4 (éclairage néon ACTIVA172)	Non traité	-0,47	0,19	-3,56	-0,47	0,96	-0,97	-0,20	3,99	4,55	4,10	4,04	-0,88	-1,14	-1,39
	Eau	-0,66	-1,56	-1,39	2,19	1,12	-1,85	-0,02	3,88	4,87	4,37	3,25	0,22	-0,67	-1,23
	Bion	-0,38	3,73	0,97	6,49	4,67	-0,62	1,83	4,54	5,28	4,91	3,81	-0,05	0,33	-1,27
C6=Serre 2 (éclairage naturel + HPS)	Non traité	0,46	0,16	-1,65	0,05	2,03	-0,50	0,31	5,20	5,25	5,13	4,63	-0,42	-0,66	-1,59
	Eau	0,33	-0,35	-0,87	0,60	2,93	-0,72	0,24	6,13	5,93	5,62	4,65	1,30	-0,15	-1,21
	Bion	3,23	7,90	6,36	6,13	6,24	1,70	-0,89	4,86	5,11	4,78	4,11	2,22	1,40	-1,16
C7=Serre 3 (éclairage naturel + HPS)	Non traité	-0,05	0,23	-1,10	-0,62	1,63	-0,13	0,33	3,44	1,65	2,50	0,15	-0,65	-0,16	-0,59
	Eau	-0,42	-1,23	-2,61	1,36	1,25	-0,57	0,48	3,42	3,43	3,51	2,34	0,21	-0,58	-0,85
	Bion	1,62	6,48	5,54	7,45	6,08	1,66	1,60	4,55	4,48	3,98	3,72	2,72	1,68	-0,05
C8=Serre 4 (éclairage naturel + néon)	Non traité	0,23	0,50	-0,94	0,19	1,26	-0,30	0,55	0,89	0,03	0,22	-0,68	-0,01	-0,03	0,44
	Eau	0,23	0,38	-0,49	2,31	2,28	0,04	0,29	1,37	1,11	1,28	-0,22	0,08	0,58	0,75
	Bion	2,58	8,28	8,08	7,30	7,92	5,60	1,82	3,44	1,61	1,84	0,88	3,93	3,00	1,60
C9= Armoire 1 (éclairage néon)	Non traité	-1,55	-0,64	0,11	-0,55	1,34	0,24	0,14	2,66	3,14	3,04	3,40	-0,39	-0,04	-1,15
	Eau	0,64	1,16	1,38	1,73	3,19	1,24	1,75	2,79	3,26	2,88	3,56	0,81	1,10	-0,59
	Bion	2,32	7,42	8,21	4,16	5,30	5,81	2,07	1,83	1,91	1,82	2,29	3,27	2,41	0,05
C10= Armoire 2 (éclairage néon)	Non traité	0,20	-0,41	-1,62	-0,72	0,72	2,85	0,03	2,38	3,27	2,78	3,62	-1,76	-0,50	-0,67
	Eau	2,25	5,52	1,79	3,62	3,70	6,49	-0,26	0,22	1,07	0,60	2,03	-1,49	0,75	-0,17
	Bion	2,84	8,57	6,78	4,63	5,43	5,37	-0,16	1,87	2,48	2,19	3,17	1,84	2,24	-0,25

Tableau 12

		FAR	CSL	APO X	GST	POX	CAD	CaIS	PECT	EDS1	WRK Y	LOX2	JAR	ACC O	EIN3
C1=Serre 1 d'élevage	Non traité	-0,76	-0,27	0,18	-0,17	0,77	0,19	-0,01	-0,18	-0,23	-0,22	0,07	-0,03	-0,05	0,03
C2=Chambre climatique 1 (éclairage HPS + MH)	Non traité	-6,15	4,58	1,08	-2,55	0,80	0,39	-1,10	0,40	-1,20	-0,55	0,36	-0,02	-0,84	-0,58
	Eau	-3,36	2,96	0,54	-2,89	1,08	0,03	-1,19	-1,05	0,47	-0,06	-0,86	-1,28	-1,90	-0,81
	Bion	-0,35	2,94	0,26	-2,84	2,09	0,17	-1,05	-0,12	3,08	-0,50	-1,44	-1,40	-1,38	-0,24
C3=Chambre climatique 2 (éclairage MH)	Non traité	-0,24	2,93	1,37	-1,31	1,30	0,58	-0,62	0,66	-0,35	-0,26	0,79	0,55	-0,17	0,65
	Eau	1,75	2,11	0,66	-2,02	1,30	0,20	-1,13	-0,64	1,32	0,76	-0,45	0,49	-0,67	0,30
	Bion	3,62	2,31	0,78	-1,77	1,92	0,22	-0,73	0,72	4,31	-0,12	0,06	0,46	-0,90	0,69
C4=Chambre climatique 3 (éclairage naturel + HPIT)	Non traité	-1,46	2,30	1,59	-2,20	0,58	0,03	-0,80	-0,51	-1,04	-0,12	0,39	-0,14	-1,19	-0,20
	Eau	0,41	2,21	0,85	-0,62	0,02	0,42	-0,35	-0,81	0,03	-0,59	-0,50	-0,14	0,18	0,08
	Bion	2,77	3,62	0,88	-0,37	2,03	0,70	-0,38	1,36	4,31	3,88	-0,65	-0,18	0,78	1,00
C5=Chambre climatique 4 (éclairage néon ACTIVA172)	Non traité	-1,06	2,44	1,11	-2,03	1,83	0,29	-0,91	-0,60	-1,63	-0,53	0,17	-0,05	-0,69	-0,72
	Eau	0,93	1,88	0,85	-2,64	1,31	-0,07	-1,16	-1,74	0,25	-1,08	-0,70	-0,39	-0,54	-0,59
	Bion	3,38	2,84	1,14	-2,67	2,93	0,21	-0,98	-0,38	3,73	1,17	-0,64	-0,10	-0,70	-0,06
C6=Serre 2 (éclairage naturel + HPS)	Non traité	0,34	2,96	1,01	-2,08	1,99	0,54	-0,87	-0,43	0,19	1,47	0,65	0,27	-0,70	-0,51
	Eau	2,57	3,59	1,05	-2,46	2,45	0,33	-0,82	-0,24	0,48	-0,21	0,68	0,14	-0,48	0,55
	Bion	5,30	4,54	0,91	-1,58	4,03	0,39	-1,12	1,60	4,35	4,24	0,37	-0,22	0,52	1,14
C7=Serre 3 (éclairage naturel + HPS)	Non traité	-0,44	-0,06	0,75	-1,02	1,26	0,07	-0,38	-0,23	-0,10	0,91	0,86	0,49	-0,57	0,21
	Eau	1,78	1,04	0,88	-2,07	1,54	0,04	-1,08	-1,02	0,36	0,29	-0,45	-0,31	-0,33	-0,01
	Bion	5,67	4,22	1,42	-0,93	3,37	0,48	-0,54	1,25	4,44	1,78	-0,11	0,55	0,31	0,96
C8=Serre 4 (éclairage naturel + néon)	Non traité	-1,20	-0,37	0,95	0,04	0,70	0,23	0,27	0,33	-0,54	1,27	0,65	0,80	0,38	-0,32
	Eau	0,38	1,52	0,45	-0,40	0,97	0,30	-0,07	0,12	0,40	1,45	0,15	0,34	0,55	0,28
	Bion	4,83	5,99	0,90	1,52	5,50	0,63	0,33	2,42	5,40	5,02	-0,17	-0,13	2,06	2,01
C9=Armoire 1 (éclairage néon)	Non traité	-0,27	0,97	0,25	-1,86	-0,78	0,00	-0,72	-0,05	0,85	-1,20	-0,07	-0,50	-0,79	0,15
	Eau	2,86	2,06	0,21	-1,14	2,36	-0,22	-0,12	2,61	3,05	2,13	0,19	-0,66	-0,82	1,05
	Bion	5,22	3,67	0,77	0,07	3,36	0,03	-0,15	2,90	5,30	5,37	-0,08	-0,58	1,02	0,91
C10=Armoire 2 (éclairage néon)	Non traité	-0,14	1,45	0,12	-0,57	-0,55	0,00	-0,96	1,36	0,32	-0,20	0,10	0,11	-0,05	0,73
	Eau	3,59	0,52	0,13	-0,09	1,75	-0,02	-0,31	3,18	3,27	-1,10	-0,24	-0,26	-0,17	0,67
	Bion	5,00	2,53	0,32	0,43	4,22	0,36	-0,64	4,23	4,88	3,94	-0,16	-0,54	0,73	1,24

Tableau 13

		PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMG R	FPPS
T° normales	Eau	0,99	-1,03	-0,48	2,02	0,63	-1,46	-0,77	-1,05	-1,05	-1,03	-1,68	-0,4	0,91	-1,39
	Bion	3,79	6,22	7,77	4,21	3,67	1,89	-0,57	-2,16	-1,35	-1,64	-1,77	-0,76	1,63	-1,12
T° normales puis stressantes	Eau	5,59	7,91	9,28	1,34	3,53	7,13	-0,01	-4,77	-4,96	-5,65	-4,77	0,13	1,36	0,77
	Bion	9,82	11,2	12,9	4,34	6,38	7,86	0,66	-3,71	-4,7	-5,86	-5,39	2,82	4,36	1,18
T° stressantes	Eau	7,02	7,46	9,57	2,04	4,78	4,79	4,62	-3,96	-4,6	-5,04	-5,27	1,61	2,43	0,92
	Bion	9,55	11,3	14	3,71	7,96	9,23	4,65	-3,93	-5,29	-6,17	-5,36	5,42	4,77	1,36
T° stressantes puis normales	Eau	2,95	1,1	-0,87	2,64	2,19	-0,27	-0,07	-1,19	-0,5	-1,01	-1,08	-1,54	1,48	-1,14
	Bion	6,46	8,67	9,55	4,9	5,36	4,57	0,12	-1,95	-1,94	-2,48	-1,63	1,35	3,17	0,77

Tableau 14

		FAR	CSL	APOX	GST	POX	CAD	CaIS	PECT	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACCO	EIN3
T° normales	Eau	2,44	-0,24	-1,29	-1,05	-1,03	-0,25	-0,45	0,48	2,02	1,15	0,19	-1,04	-0,8	0,32
	Bion	3,34	0,91	-0,97	-0,33	1,96	0,11	-0,54	1,22	2,96	0,93	0,16	-0,82	-0,24	0,14
T° normales puis stressantes	Eau	1,16	0,82	-1,45	2,4	0,97	0,43	1,12	3,49	2,56	1,03	1,35	1,03	1,69	1,94
	Bion	0,45	4,65	-1,18	1,89	5,54	0,4	1,05	2,04	4,79	5,48	-0,66	-0,63	1,29	0,98
T° stressantes	Eau	1,16	1,26	-1,23	2,28	1,96	0,66	0,65	2,77	2,46	1,51	0,49	0,45	1,16	1,29
	Bion	-0,47	6,17	-0,56	2,83	6	0,93	1,3	2,56	4,44	4,66	-0,64	-0,83	1,52	1,23
T° stressantes puis normales	Eau	1,88	-0,13	-0,86	-0,4	0,79	-0,03	-0,29	1,16	2,45	-0,58	0,39	-0,72	-0,61	0,82
	Bion	4	2,71	-0,57	1,68	3,72	0,19	0,09	1,9	3,73	4,93	-0,15	-0,59	1,27	0,89

5

Tableau 15

		PR1	PR2	PR4	PR5	PR8	PR14	PR15	PAL	ANS	CHS	DFR	PPO	HMG R	FPPS
Arrosage normal	Eau	-1,0	4,7	5,1	1,8	1,3	1,3	-0,3	1,3	1,8	1,8	0,7	-0,1	-0,1	0,2
	Bion	2,8	10,3	12,0	5,2	5,0	5,0	-0,4	1,3	1,1	1,1	0,9	5,1	2,4	1,0
PEG à J-1	Eau	0,1	1,5	5,7	1,8	1,6	3,5	0,5	0,9	1,5	1,7	1,1	0,2	0,2	-0,3
	Bion	7,2	10,8	11,0	6,2	4,6	7,3	0,0	1,3	1,4	1,6	1,4	2,7	1,9	0,5
PEG à J0	Eau	1,8	4,0	7,9	0,8	2,5	1,0	-0,3	1,0	2,1	1,6	0,7	1,9	0,2	0,0
	Bion	7,1	10,6	11,0	6,1	4,8	4,5	-1,0	0,9	1,5	1,3	1,3	2,6	1,9	0,1

Tableau 16

		FAR	CSL	APOX	GST	POX	CAD	CaIS	PECT	EDS1	WRKY	LOX2	JAR	ACCO	EIN3
Arrosage normal	Eau	1,2	1,1	0,3	0,1	-1,2	-0,5	0,1	-0,3	1,6	-0,3	-0,3	-0,2	0,2	-2,1
	Bion	4,0	5,5	0,1	1,6	2,0	-0,3	-0,2	1,5	4,7	5,9	-0,5	-0,3	1,8	-0,7
PEG à J-1	Eau	3,0	1,8	0,4	0,4	-0,9	0,0	0,0	1,6	1,3	0,2	0,7	0,2	0,9	-1,4
	Bion	5,9	4,7	0,9	1,1	1,0	-0,1	0,3	2,7	4,4	5,1	1,1	0,5	2,1	-0,4
PEG à J0	Eau	2,8	1,7	0,6	0,4	-2,0	0,1	0,5	0,7	1,1	0,2	1,1	0,4	0,8	-1,6
	Bion	5,0	4,7	0,4	1,0	2,0	-0,2	0,1	1,5	4,4	3,7	0,5	0,0	1,2	-0,9

Essai 4 : Vérification de la capacité de l'outil à étudier diverses variétés de Pommier pour leur réponse aux SDN

Méthode :

5 Cette expérimentation est effectuée une fois sur jeunes scions greffés, de 4 variétés en croissance active : Braeburn, Gala, Granny Smith, MM106 élevés, directement en serre d'expérimentation.

• Pour l'analyse des défenses

10 Les scions sont pulvérisés jusqu'à refus au pulvérisateur à air comprimé avec du Bion (0,4 g/l) ou de l'eau (J0).

Des prélèvements des feuilles F3 (3ème étage foliaire, feuilles jeunes non encore complètement développées) sont effectués à J0 (avant traitement) et à J3 sur l'ensemble des lots traités (trois ½ limbes prélevés sur trois feuilles F3 (jeunes feuilles non entièrement développées) poolées / prélèvement).

15 Les échantillons sont extraits et analysés à l'aide de l'outil de manière identique à celle de l'essai 2.

• Pour l'analyse du pouvoir de protection

20 Les scions sont pulvérisés de la même manière jusqu'à refus au pulvérisateur à air comprimé avec du Bion (0,4 g/l) ou de l'eau (J0).

A J4, les 2 plus jeunes feuilles développées (F1 et F2) de chaque scion sont coupées, au 2/3 et perpendiculairement à la nervure principale, à l'aide de ciseaux préalablement trempés dans une suspension bactérienne d'*Erwinia amylovora* préparée dans de l'eau stérile à 25 10^8 cfu/ml. Une douzaine de pousses en croissance active ont été inoculées par variété et par traitement.

La notation des symptômes, c'est-à-dire présence d'une nécrose sur la nervure des feuilles inoculées (noté 0,5), ou ayant atteint le pétiole (noté 1), ou ayant évolué sur tige (noté 1+longueur de nécrose sur tige en cm), est réalisée 3 semaines après inoculation. La longueur 30 moyenne de nécrose sur scions pulvérisés (μ_{eau}) est calculée et l'efficacité relative de protection du Bion est estimée selon la formule : $100 - ((Lg_{\text{Bion}} \times 100) / \mu_{\text{eau}})$.

Résultats :

35 Le Bion provoque des inductions dans les 4 variétés selon un profil qualitatif assez similaire (Figure 2A).

Au niveau quantitatif, on ne repère pas une variété qui « réponde » globalement plus fortement qu'une autre. Les différences de niveaux d'induction varient en amplitude selon les gènes.

Concernant les efficacités de protection de ces 4 variétés par le Bion, vis-à-vis du feu bactérien, on observe des différences marquées, Granny Smith étant la variété « répondant » le mieux au Bion, et Gala, celle « répondant » le moins (Figure 2B).

5 Conclusion :

L'outil mis au point sur des semis de Golden Delicious peut donc être utilisé sur d'autres variétés de Pommier. Il permet de révéler la réactivité des 4 autres variétés testées ici, Braeburn, Gala, Granny Smith et MM106, à un traitement au Bion, réactivité confirmée par les protections observées après inoculation artificielle par *E. amylovora*.

- REVENDICATIONS -

1.- Dispositif pour déterminer ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou parties de plantes, lequel dispositif comprend des moyens de détermination du niveau d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon de plantes ou parties de plantes, lesdits moyens de détermination comprenant :

(a) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15 ;

(b) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : PAL, CHS, DFR, ANS, PPO ;

(c) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : HMGR, FPPS, Far ;

(d) un moyen de détermination du niveau d'expression du gène cible CSL ;

(e) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes suivants : APOX, GST, POX ;

(f) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : CalS, Pect, CAD ;

(g) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : EDS1, WRKY ;

(h) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : LOX2, JAR ;

(i) un moyen de détermination du niveau d'expression d'au moins un gène cible choisi parmi les gènes cibles suivants : ACCO, EIN3.

2.- Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les moyens de détermination du niveau d'expression des gènes suivants :

(i) pour le groupe (a), un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : PR-1, PR-2, PR-4 et/ou PR-8, un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PR-5, un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PR-14 et un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PR-15,

(ii) pour le groupe (b), un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PAL, un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : CHS, DFR ou ANS, et un moyen de détermination du niveau d'expression du gène PPO,

(iii) pour le groupe (c), un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : HMGR et Far, et un moyen de détermination du niveau d'expression du gène FPPS,

(iv) pour le groupe (e), un moyen de détermination du niveau d'expression du gène APOX et un moyen de détermination du niveau d'expression de l'un au moins des gènes suivants : GST et POX.

3.- Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend les moyens de détermination du niveau d'expression de la combinaison des gènes

cibles suivants : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, PR-15, PAL, CHS, DFR, ANS, PPO, HMGR, FPPS, Far, CSL, APOX, GST, POX, CalS, Pect, CAD, EDS1, WRKY, LOX2, JAR, ACCO, EIN3.

4.- Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdits moyens de détermination du niveau d'expression d'un gène cible sont choisis parmi (i) les fragments d'acide nucléique capables de s'hybrider de manière spécifique aux ARNm exprimés par ledit gène cible ou aux ADNc correspondants, ou à des fragments desdits ARNm ou desdits ADNc, et/ou (ii) les anticorps se liant spécifiquement aux produits d'expression dudit gène cible, desdits ARNm ou desdits ADNc, ou fragments desdits produits d'expression.

5.- Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que les fragments d'acide nucléique consistent en des amorces nucléotidiques s'hybridant spécifiquement avec les ARNm, les ADNc, ou des fragments de ceux-ci.

6.- Dispositif selon la revendication 5, caractérisé en ce que lesdites amorces nucléotidiques sont adaptées à la détermination du niveau d'expression des gènes cibles par une méthode de PCR quantitative.

7.- Dispositif selon la revendication 6, caractérisé en ce que les amorces sont choisies parmi les séquences suivantes SEQ ID n°32 à 87.

8.- Dispositif selon la revendication 4, caractérisé en ce que lesdits fragments d'acide nucléique ou lesdits anticorps sont immobilisés sur un support.

9.- Dispositif selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il consiste en une puce à ADN.

10.- Procédé pour identifier un profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles permettant de déterminer, ou au moins d'évaluer, un état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou de parties de plantes, lequel procédé comprend les étapes suivantes :

(i) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles au moyen du dispositif selon l'une des revendications 1 à 9, sur un ensemble de plantes ou de parties de plantes, dont l'état de stimulation de leurs défenses naturelles est connu, puis

(ii) déterminer un profil d'expression de ladite combinaison de gènes cibles correspondant à un état déterminé de stimulation des défenses naturelles desdites plantes ou parties de plantes, partant des données issues de l'étape (i).

11.- Procédé pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie de plante, comprenant les étapes suivantes :

(i) prélever un échantillon à partir de ladite plante ou de ladite partie de plante,

(ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans ledit échantillon prélevé à l'étape (i), au moyen du dispositif selon l'une des revendications 1 à 9,

(iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence,

(iv) déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles de ladite plante ou de ladite partie de plante, à partir dudit profil d'expression obtenu lors de l'étape (ii).

12.- Procédé pour sélectionner une substance ayant la propriété de moduler l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie de plante, comprenant les étapes suivantes :

(i) mettre en contact ladite plante ou ladite partie de plante avec la substance à tester,

5 (ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon prélevé à partir de ladite plante ou de ladite partie de plante suite à l'étape (i), au moyen du dispositif selon l'une des revendications 1 à 9,

(iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence, pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles dans ledit échantillon,

10 (iv) sélectionner positivement ladite substance si la comparaison à l'étape (iii) montre que ladite substance testée à l'étape (i) module l'état de stimulation des défenses naturelles de ladite plante ou de ladite partie de plante.

13.- Procédé selon la revendication 12, pour sélectionner une substance ayant la propriété de générer un état de stimulation des défenses naturelles d'une plante ou d'une partie
15 de plante appartenant à la famille des *Rosaceae*, assurant une protection vis à vis d'un stress biotique, caractérisé en ce que le profil d'expression de référence à l'étape (iii) correspond aux valeurs observées pour des échantillons de plantes ou de parties de plantes non soumises à un stress ou un stimulateur des défenses naturelles, et en ce que l'étape (iv) consiste à sélectionner positivement ladite substance testée si le profil d'expression obtenu à l'étape (ii), et
20 comparé à l'étape (iii), montre une surexpression de la combinaison de gènes cibles suivantes : PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-8, PR-14, HMGR, Far, CSL, POX, Pect, EDS1 et WRKY.

14.- Procédé pour sélectionner une plante présentant un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de leur conférer une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt, comprenant les étapes suivantes :

25 (i) appliquer ledit ou lesdits stress à une plante ou une partie de plante,

(ii) déterminer le profil d'expression d'une combinaison de gènes cibles dans un échantillon prélevé à partir de la plante ou de ladite partie de plante, au moyen du dispositif selon l'une des revendications 1 à 9,

30 (iii) comparer le profil d'expression obtenu à l'étape (ii) avec un profil d'expression de référence, pour déterminer ou évaluer l'état de stimulation des défenses naturelles dans ledit échantillon,

(iv) sélectionner positivement ladite plante ou ladite partie de plante si la comparaison de l'étape (iii) montre que ladite plante ou ladite partie de plante possède un état de stimulation des défenses naturelles susceptible de leur conférer une résistance améliorée à au moins un stress biotique et/ou abiotique d'intérêt.

35 15.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, caractérisé en ce que la ou les plantes appartiennent à la famille des *Rosaceae*.

1 / 2

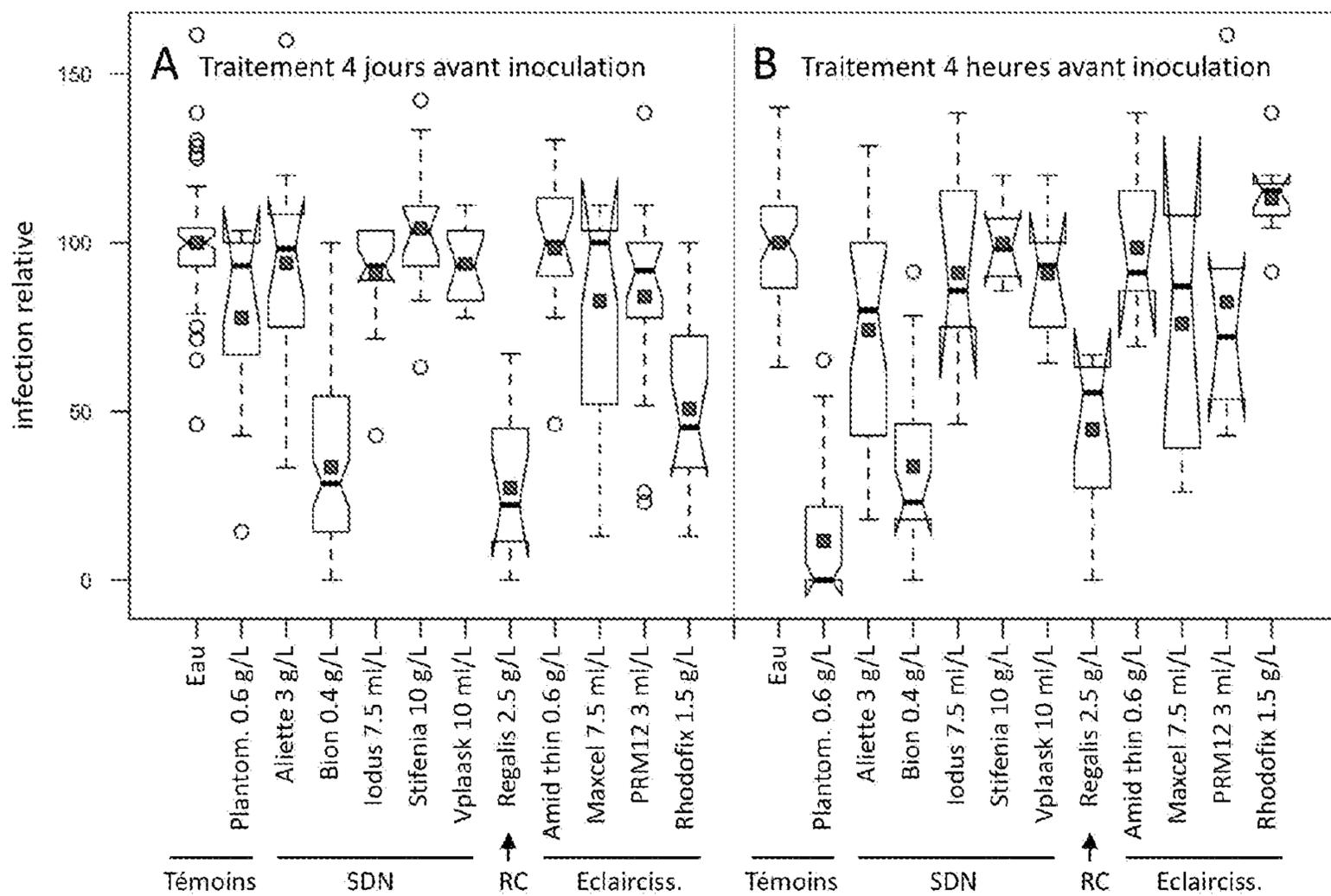
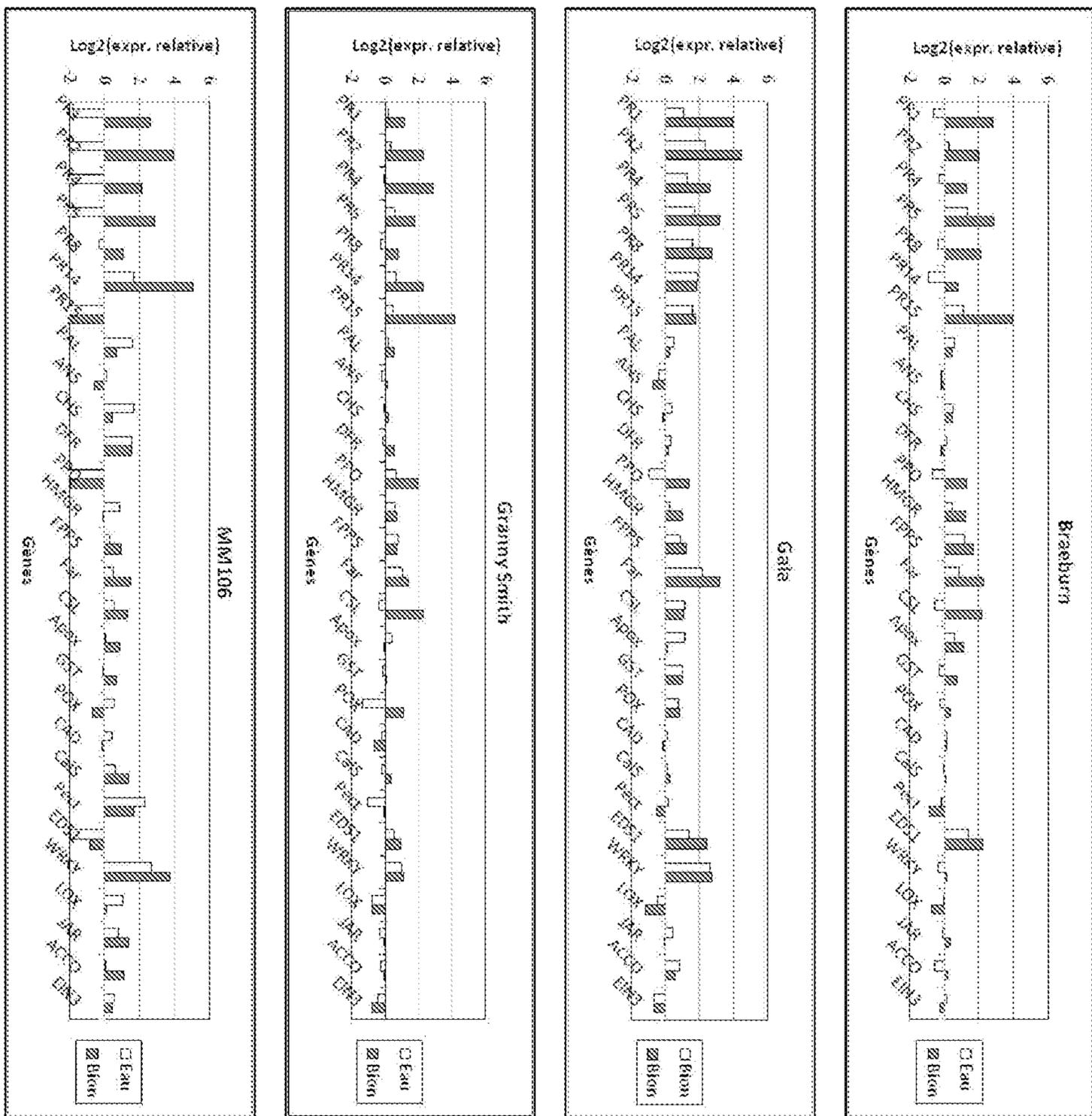


Figure 1

A



B

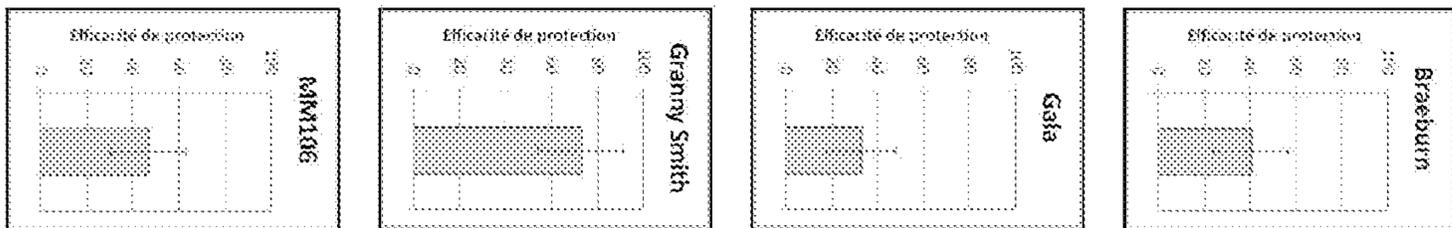


Figure 2