

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

\*\*\* \* \*\*\*

Université de Carthage

\*\*\* \* \*\*\*

**Institut National des Sciences  
Appliquées et de Technologie**



## **Projet de Fin d'Etudes**

Pour l'obtention du

**Diplôme National d'Ingénieur  
en Sciences Appliquées et en Technologie**

Filière : Biologie Industrielle

Sujet :

**Identification des séquences impliquées dans la  
résistance conférée par le gène Ma de résistance aux  
nématodes chez le myrobolan et autres espèces  
Prunus**

*Réalisé par :* **Chaima Bengagi**

Entreprise d'accueil :



Institut National de la Recherche Agronomique– INRA

*Soutenu le 03 /10/17*

Responsable à l'entreprise : Mr Henri DUVAL

Responsable à l'INSAT : Mr Ferid ABIDI

**Année Universitaire : 2016/2017**

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

\*\*\* \* \*\*\*

Université de Carthage

\*\*\* \* \*\*\*

Institut National des Sciences  
Appliquées et de Technologie



## Projet de Fin d'Etudes

Pour l'obtention du

### Diplôme National d'Ingénieur en Sciences Appliquées et en Technologie

Filière : Biologie Industrielle

Sujet :

**Identification des séquences impliquées dans la  
résistance conférée par le gène Ma de résistance aux  
nématodes chez le myrobolan et autres espèces Prunus**

Réalisé par : **Chaima Bengagi**

Entreprise d'accueil :



Institut National de la Recherche Agronomique– INRA -

*Soutenu le 03 /10/17*

|  |   |
|--|---|
| <b>Responsable à l'entreprise :</b><br>Prénom et NOM : Henri Duval | <b>Responsable à l'INSAT :</b><br>Prénom et NOM : Ferid Abidi |
|--|---|

**Année Universitaire : 2016/2017**

# *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon maître de stage, Henri Duval, pour avoir su rendre ce stage passionnant du premier au dernier jour. Je le remercie également pour la confiance qu'il a régulièrement placée en moi durant ces six mois et qui a été un moteur puissant de ma motivation pour ce projet.*

*Je remercie Jean Paul Bouchet pour les nombreux conseils et l'aide qu'il m'a procuré sur le domaine de la bio-informatique mais aussi pour sa gentillesse et le temps qui m'a accordé malgré son emploi chargé.*

*Merci également à Carole Confolent pour m'avoir appris toutes les techniques de biologie moléculaire utilisées durant ce stage.*

*Je remercie tout le personnel de l'équipe G2IP et du GAFL en général pour leur accueil chaleureux qui a fait de ce stage un véritable bonheur.*

*Je remercie GIS Fruits pour le soutien financier de ce projet.*

*Je voudrais présenter mes remerciements à mon encadreur Ferid Abid pour sa patience et son soutien qui m'a été précieux afin de mener mon travail à bon port.*

*Je remercie profondément les membres de jury pour l'honneur qu'ils m'ont accordé en acceptant d'évaluer mon travail et tous mes enseignants à l'INSAT pour m'avoir guidé durant mon parcours*

# *Dédicaces*

*A mes chers parents Houssine et Souad*

*Sources de mes joies, secrets de ma force*

*Vous serez toujours le modèle*

*Papa, dans ta détermination, ta force et ton honnêteté*

*Maman dans ta bonté, ta patience et ton dévouement pour nous*

*Merci pour tous vos sacrifices pour que vos enfants grandissent et prospèrent*

*Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie au bien être de  
vos enfants*

*Merci d'être tout simplement mes parents*

*C'est à vous que je dois cette réussite*

*A mon très cher frère Marwen, son épouse Manel et leurs petites  
ange Osua*

*Mon cher frère qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour  
exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mon  
ange gardien.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de  
réussite.*

*A mon très cher frère Semah et son épouse Fatma*

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte  
pour vous. Je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection  
si sincère.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de  
réussit*

### *A mon très cher frère Wassim*

*Votre soutien moral et matériel, votre gentillesse sans égal, m'ont permis de réussir mes études. Sans votre aide et votre encouragement ce travail n'aurait vu le jour.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite*

### *A ma chère cousine Nadia*

*Ma chère Nadia tu es mon âme sœur belle et fidèle qui m'aime vraiment  
Tous les mots du monde ne suffiront pas pour dire combien je t'aime*

### *A mes chers ami(e)s:*

*Refka, Wala, RYM, Ichrak, Rakia, Fauzia, Dorsaf, Balkis, Nourhen  
Mourad, Yosra, Mariem, Safa, Marwa*

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous Exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des Frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.  
En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de Tous les moments que nous avons passé ensemble,  
Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de Bonheur.*

*A tous les membres de la famille Bengagi et Benkaji, petits et grands*

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon Affection*

# Table des matières

---

|  |      |
|--|------|
| Liste des figures .....  | viii |
| Liste des tableaux .....   | ix   |
| Liste des abréviations.....  | x    |
| 1 Introduction.....  | 1    |
| 1.1 Introduction générale.....   | 2    |
| 1.2 Présentation de l'INRA : Institut National de Recherche Agronomique..... | 4    |
| 2 Synthèse bibliographique .....   | 5    |
| 2.1 Les nématodes.....   | 6    |
| 2.1.1 <i>Les nématodes phytoparasites</i> .....                              | 6    |
| 2.1.1.1 Les différentes formes de parasitisme.....                           | 6    |
| 2.1.1.2 Dégâts directs et indirects - Importance économique.....             | 8    |
| 2.1.2 Les nématodes phytoparasites du genre <i>Meloidogyne</i> .....         | 9    |
| 2.1.2.1 Position systématique et répartition .....                           | 9    |
| 2.1.2.2 Cycle de développement .....   | 10   |
| 2.1.2.3 Moyens de lutte contre les <i>Meloidogyne</i> .....                  | 11   |
| 2.1.2.4 La résistance des plantes aux nématodes.....                         | 12   |
| 2.2 Les espèces du genre <i>Prunus</i> .....                                 | 13   |
| 2.2.1 Classification et origines du genre <i>Prunus</i> .....                | 13   |
| 2.2.2 Données génétiques et moléculaires.....                                | 14   |
| 2.3 Les gènes de résistance .....  | 15   |
| 2.3.1 Introduction .....   | 15   |
| 2.3.2 Les NBS-LRR .....  | 15   |
| 2.3.2.1 Le domaine NBS (ou NB-ARC).....                                      | 15   |
| 2.3.2.2 Le domaine LRR.....  | 16   |
| 2.3.2.3 Le domaine TIR.....  | 16   |
| 2.3.3 Les gènes de résistance chez les <i>Prunus</i> .....                   | 17   |
| 3 Matériel et méthodes .....   | 18   |
| 3.1 Matériels.....   | 19   |
| 3.1.1 Matériel végétal.....  | 19   |
| 3.1.2 Appareils utilisés.....  | 21   |
| 3.2 Méthodes.....  | 21   |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.2.1   | Partie moléculaire .....  | 21 |
| 3.2.1.1 | Extraction D'ADN.....   | 21 |
| 3.2.1.2 | PCR.....  | 21 |
| 3.2.1.3 | Analyse de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose .....   | 22 |
| 3.2.1.4 | Séquençage des fragments d'ADN.....   | 22 |
| 3.2.1.5 | Génotypage par marqueur kasp®.....  | 22 |
| 3.2.2   | Analyse bio-informatique.....   | 23 |
| 3.2.2.1 | Intégration des séquences issues de banque bac dans le génome de référence.....                     | 24 |
| 3.2.2.2 | Alignement des séquences NGS illumina sur les nouvelles références.....                             | 25 |
| 3.2.2.3 | Obtention des séquences consensus du gène Ma (IGV) .....  | 25 |
| 3.2.2.4 | Alignement des séquences consensus .....  | 26 |
| 3.2.2.5 | L'arbre phylogénétique.....   | 27 |
| 3.2.2.6 | Recherche des SNP spécifique et recherche de marqueur Kasp®.....                                    | 28 |
| 4       | Résultats et Discussion.....  | 30 |
| 4.1     | Analyse des séquences.....  | 31 |
| 4.1.1   | Rappel des données acquises .....   | 31 |
| 4.1.2   | Obtention de nouvelles séquences de gène orthologue Ma à partir des séquences NGS disponibles ..... | 32 |
| 4.1.2.1 | Séquences myrobolan : P2175 (MA/ma) et P1079 (MA/MA).....   | 34 |
| 4.1.2.2 | Séquences pêcher .....  | 35 |
| 4.1.2.3 | Séquences amandier.....   | 37 |
| 4.1.2.4 | Alignement multiples sur toutes les espèces Prunus.....   | 39 |
| 4.1.3   | Recherche et mise au point de marqueurs Kasp® pour le gène RMja.....                                | 41 |
| 4.1.3.1 | Recherche du SNP.....   | 41 |
| 4.1.3.2 | Recherches d'amorces .....  | 42 |
| 4.1.3.3 | Génotypage de nouveaux hybrides à partir du nouveau marqueur Kasp.....                              | 43 |
| 4.2     | Séquençage Sanger de deux régions de Ma (PL4 et LRR).....   | 45 |
| 4.2.1   | Construction des amorces.....   | 45 |
| 4.2.2   | PCR et électrophorèse sur gel pour séquençage .....   | 45 |
| 4.2.3   | Lecture du séquençage.....  | 46 |
| 5       | Conclusion et perspectives .....  | 48 |
| 6       | Références bibliographiques.....  | 50 |
|         | Annexes .....   | 52 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1 :Schéma de l'organisation d'un nématode parasite des plantes. A : femelle vue en entier. B : détail de la partie antérieure (région de l'œsophage). C : coupe dans la partie moyenne du corps. D : partie postérieure du mâle.[4] ..... | 7  |
| Figure 2 : Racines contenant des galles de porte-greffe pêcher(photo H Duval, INRA) ..   | 10 |
| Figure 3 : Cycle de développement des nématodes à galles .....   | 11 |
| Figure 4: Classification du prunier myrobolan ( <i>P cerasifera</i> ) du genre <i>Prunus</i> et, d'après Redher (1954)[4].....   | 14 |
| Figure 5 : schéma récapitulatif du rôle de chaque domaine.....   | 17 |
| Figure 6 : Diagramme d'étapes d'analyse des séquences.....   | 23 |
| Figure 7 : Interface de site NCBI .....  | 24 |
| Figure 8: schéma explicative de l'intégration du bac dans le génome de référence.....  | 24 |
| Figure 9 : obtention du séquence consensus.....  | 25 |
| Figure 10 : importation des séquences .....  | 26 |
| Figure 11 : alignement des séquences .....   | 26 |
| Figure 12 : création de séquence reverse .....   | 27 |
| Figure 13 : les étapes de création d'arbre phylogénétique sous CLC.....  | 28 |
| Figure 14 : lancer Primer Blast.....   | 29 |
| Figure 15 : structure des allèles Ma et Prupe G7. 6500 .....   | 31 |
| Figure 16 :alignement des reads d'abricot sur la référence pêcher V2 76H19.....  | 34 |
| Figure 17: Arbre phylogénique Ma pour les variétés abricot et myrobolan.....   | 35 |
| Figure 18 : Arbre phylogénique Ma pour les variétés pêcher ((UPGMA, Distance Jukes-Cantor) .....   | 36 |
| Figure 19 : alignement des reads Illumina d'Alnem sur la référence pêcher V2 alnem .....   | 37 |
| Figure 20 : alignement des reads alnem sur la référence pêcher V2.....   | 38 |
| Figure 21 : arbre phylogénique d'amandier (UPGMA, Distance Jukes-Cantor) .....   | 38 |
| Figure 22 : Arbre phylogénique avec différentes variétés et espèces <i>Prunus</i> ((UPGMA, Distance Jukes-Cantor).....   | 40 |
| Figure 23 : Alignement des différentes séquences et détection d'un SNP .....   | 41 |
| Figure 24 résultats du test kasp® des marqueurs sp903, 904, 905, 906 sur des hybrides F2 Lauranne x Alnem .....  | 42 |
| Figure 25 : Résultats du test KASP pour le marqueur SP903 sur 150 hybrides Lauranne x Alnem .....  | 43 |
| Figure 26 : les deux couples d'amorces de LRR et PL4 et leur position sur le gène RMja .....   | 45 |
| Figure 27 : séparation d'ADN sur gel d'agarose .....   | 46 |
| Figure 28: résultat du séquençage du domaine PL4 pour P1079.....   | 46 |



## Liste des tableaux

---

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Production mondiale (en tonnes) et répartition géographique de fruits issus des Prunus comparées aux productions de pommes et poires pour l'année 2003 (source : FAO).....  | 13 |
| Tableau 2 : Spectre de résistance aux <i>Meloidogyne</i> des sources <i>Prunus</i> du projet et des trois gènes majeurs correspondants et spectre attendu par pyramidage dans un exemple du type 'hybride 3-voies'. R, résistant ; S, sensible [20] ..... | 17 |
| Tableau 3 : Liste des variétés de la collection Prunus utilisés pour étudier le polymorphisme du gène Ma. ....  | 19 |
| Tableau 4 : Liste des variétés de Prunus reséquencées (NGS illumina) et analysées pour l' étude du le polymorphisme du gène Ma.....   | 20 |
| Tableau 5 : Position du gène Ma dans les différents bacs et patch.....  | 33 |
| Tableau 6: % identité de la séquence (partie supérieure) et différence de nombre de bases (partie inférieure) .....   | 35 |
| Tableau 7 : % identité de la séquence et différence de nombre de bases pour les pêcheurs .....  | 36 |
| Tableau 8 : % identité de la séquence et différence de nombre de bases entre amandier   | 39 |
| Tableau 9 : %d'identité et différence entre Prunus .....  | 40 |
| Tableau 10: Génotypage par technique kasp® et phénotypage d'hybrides amandier F2 Lauranne x Alnem .....   | 43 |

## Liste des abréviations

---

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**NCBI**: National Center for Biotechnology Information

**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool

**pb** : paire de bases

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétracétique

**TBE** : Tris Borate-EDTA

**dNTP** : Désoxynucléotide tri-phosphate

**ADN** : Acide Désoxyribo Nucléique

**BET**: Bromure d'Ethidium

**NBS-LRR**: Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat

**LRR**: Leucine-rich repeat

**NBS**: Nucleotide-binding site

**TIR**: Toll Interleukin 1 Receptor-like

**GDR**: Genome Database for Rosaceae

**KASP**: Kompetitive Allele Specific PCR

**SNP**: Single-Nucleotide Polymorphism

1

# Introduction

## 1.1 Introduction générale

Les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sont des parasites obligatoires extrêmement polyphages des racines, dont l'impact au niveau mondial est aujourd'hui estimé entre cinq et dix pour cent des pertes de récoltes, toutes cultures confondues.

La lutte chimique contre ces parasites est coûteuse et donc réservée aux cultures dégagant les plus fortes plus-values. La toxicité élevée des molécules nématicides et leur impact sur l'environnement sont à l'origine de leur réduction progressive d'emploi et à terme de leur probable retrait complet du marché. Face à cette évolution, l'utilisation de variétés résistantes aux nématodes à galles est une réelle alternative d'avenir. Cette méthode doit répondre à un objectif de durabilité car l'extrême polyphagie des nématodes *Meloidogyne* leur permet de maintenir dans le sols cultivés aux dépens des plantes adventices.[1]

Chez les arbres fruitiers du genre *Prunus*, le pêcher et l'amandier (*Amygdalées*) sont les espèces les plus touchées par les nématodes *Meloidogyne* mais de nombreux pruniers sont également très sensibles. Divers porte-greffe résistants aux *Meloidogyne* ont été développés en priorité pour le pêcher, mais ceux-ci présentent des spectres de résistance incomplets et sont souvent peu adaptés aux conditions méditerranéennes de culture. De ce fait une résistance à spectre complet et haut niveau a été recherchée plus récemment chez d'autres espèces et mise en évidence

Chez plusieurs accessions de prunier myrobolan (*Prunus Cerasifera*).la bonne aptitude de ce prunier au croisement avec le pêcher, l'amandier ou l'abricotier permet la création d'hybrides interspécifiques qui sont potentiellement utilisables comme porte-greffe pour tous les *Prunus* et en font une espèce centrale de programmes d'amélioration des porte-greffe.de point de vue nématologique, ces hybrides offrent la possibilité de cumuler les gènes de plusieurs sources de résistances aux *Meloidogyne*. Pour cette stratégie, il est important de connaître la relation entre les gènes.

La résistance à spectre complet mise en évidence chez certains clones de myrobolan est monogénique. Elle est portée par le gène Ma, gène majeur et complètement dominant dont deux allèles ont été identifiés chez les accessions P2175 et P2980 au niveau du chromosome 7 alors que chez l'amandier un gène a été identifié et serait un orthologue du gène Ma.

Dans ce cadre notre travail aborde :

- L'étude des gènes orthologues de Ma dans différentes espèces Prunus.
- L'analyse de la séquence candidate, par utilisation de données de reséquençage illumina alignées sur des séquences de référence de BAC contenant le gène Ma.
- La mise au point de marqueurs moléculaires Kasp® pour le génotypage d'hybrides porte-greffe Prunus.

## 1.2 Présentation de l'INRA : Institut National de Recherche Agronomique

L'Inra a une vocation finalisée bien identifiée au sein de la recherche publique française. Ses missions ont été définies dans les lois sur la recherche de 1982 et 2006.

Depuis 1982, l'Inra a le statut d'établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST), placé sous la double tutelle des ministères en charge de la Recherche et de l'Agriculture.

Son champ de compétence, fixé à sa création en 1946 autour des recherches pour « la production agricole, la production animale et la conservation et la transformation des produits agricoles » est précisé en 1984 : « organiser et exécuter toute recherche scientifique intéressant l'agriculture et les industries qui lui sont liées ».

Si l'agriculture est toujours une question centrale dans les recherches de l'Inra, les questionnements se sont profondément renouvelés et les activités de l'Institut ont naturellement évolué depuis sa création. Dans un contexte de changements démographiques, économiques et environnementaux globaux, la recherche agronomique est désormais confrontée à des défis planétaires : fournir de manière durable, en quantité et en qualité, de quoi nourrir, dans un marché mondialisé complexe, près de 10 milliards d'individus, tout en palliant la raréfaction des énergies fossiles.

Initialement centrées sur la production agricole, les recherches se sont progressivement étendues à la transformation des produits et l'organisation du secteur agroalimentaire, puis aux questions liées à l'environnement, à la gestion des territoires et à l'alimentation (qualité des produits, valeur nutritionnelle et sécurité des aliments). Avec l'arrivée du Haut débit, les sciences biologiques ont connu une véritable révolution : elles sont en effet au cœur d'enjeux économiques qui bouleversent la concurrence et la coopération entre recherche publique et recherche privée. Le progrès de la modélisation et des outils informatiques permettent d'aborder l'étude de systèmes complexes à différents niveaux d'organisation, sur des échelles de temps et d'espace diversifiées. Les sciences sociales, enfin, sont davantage mobilisées par des recherches dont les implications sociales, économiques, culturelles, éthiques ne cessent de croître.

La recherche finalisée implique que les connaissances qu'élabore l'Inra soient disponibles pour la société et puissent être utilisées, avec déontologie et éthique, dans diverses innovations. De la même manière, cela implique que les expertises qu'il conduit sont utilisées par les décideurs, prioritairement publics et politiques (site INRA <http://institut.inra.fr/Missions> ).

2

# Synthèse bibliographique

## 2.1 Les nématodes

Les nématodes sont des vers ronds de la classe des Némathelminthes. Leur structure anatomique est simple : leur corps est rond, normalement cylindrique et allongé, sans tête bien définie, non segmenté et à symétrie bilatérale. Sur le plan anatomique, ils sont constitués extérieurement d'un fourreau épidermique à l'intérieur duquel sont attachés quatre faisceaux musculaires recouverts par une cuticule flexible. Cet ensemble forme un tube dans lequel prennent place les appareils digestif et reproducteur[2].

Ce groupe, chez lequel plus de 20 000 espèces ont été décrites [3] et plusieurs dizaines de milliers restent à découvrir (notamment pour les espèces marines), présente une grande diversité de taille (de quelques dixièmes de mm à plus d'un mètre pour la filaire de Médine *Dracunculus medinensis*) et de mode de vie. Les nématodes peuvent être aquatiques et se rencontrer en eaux salées ou douces, ou bien terrestres : dans ce dernier cas, ils se déplacent dans le film d'eau entourant les particules de sol. Parmi les nématodes terrestres, certains sont libres (comme l'espèce modèle *Caenorhabditis elegans*), d'autres sont parasites d'animaux vertébrés (*Ascaris*, *Brugia*, *Trichinella*), invertébrés (*Heterorhabditis*, *Steinernema*) ou de plantes (phytoparasites).

### 2.1.1 Les nématodes phytoparasites

#### 2.1.1.1 Les différentes formes de parasitisme

Les nématodes phytoparasites appartiennent essentiellement à deux ordres : les Tylenchida et les Dorylaimida. Environ 4000 espèces sont actuellement décrites [3]. Ce sont des parasites obligatoires qui se nourrissent du cytoplasme des cellules végétales. Les différentes espèces partagent un caractère morphologique commun : un stylet buccal leur permettant de perforer les parois végétales (Fig. 1-1). Si certains nématodes gagnent les parties aériennes de la plante à partir du sol (*Ditylenchus dipsaci*, parasite des feuilles, tiges et bulbes), ou via des insectes vecteurs (*Bursaphelenchus xylophilus*, parasite du pin et transmis par les Longicornes), la plupart d'entre eux sont des parasites du système racinaire. Chez ces derniers, on distingue alors de nombreuses stratégies de parasitisme allant de l'ectoparasitisme « migrateur » à l'endoparasitisme « fixé ». Les nématodes phytoparasites sont classiquement répartis en trois catégories :

- Les *ectoparasites* : larves et adultes se trouvent à l'extérieur des tissus végétaux et ponctionnent les cellules à l'aide de leur stylet. C'est le cas des nématodes vecteurs de virus des genres *Xiphinema* et *Longidorus* ;
- Les *semi-endoparasites* : les nématodes ne sont que partiellement engagés dans les tissus et l'adulte femelle pond à l'extérieur de la plante. Citons par exemple
- *Tylenchulus semi-penetrans* sur racines de *Citrus* ;



- Les *endoparasites* : les larves pénètrent puis se développent jusqu'au stade adulte à l'intérieur des tissus végétaux. Cette catégorie se divise en deux groupes : les sédentaires tels que les nématodes à kyste des genres *Heterodera* et *Globodera* et les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* et les migrants tels que les *Pratylenchus*.

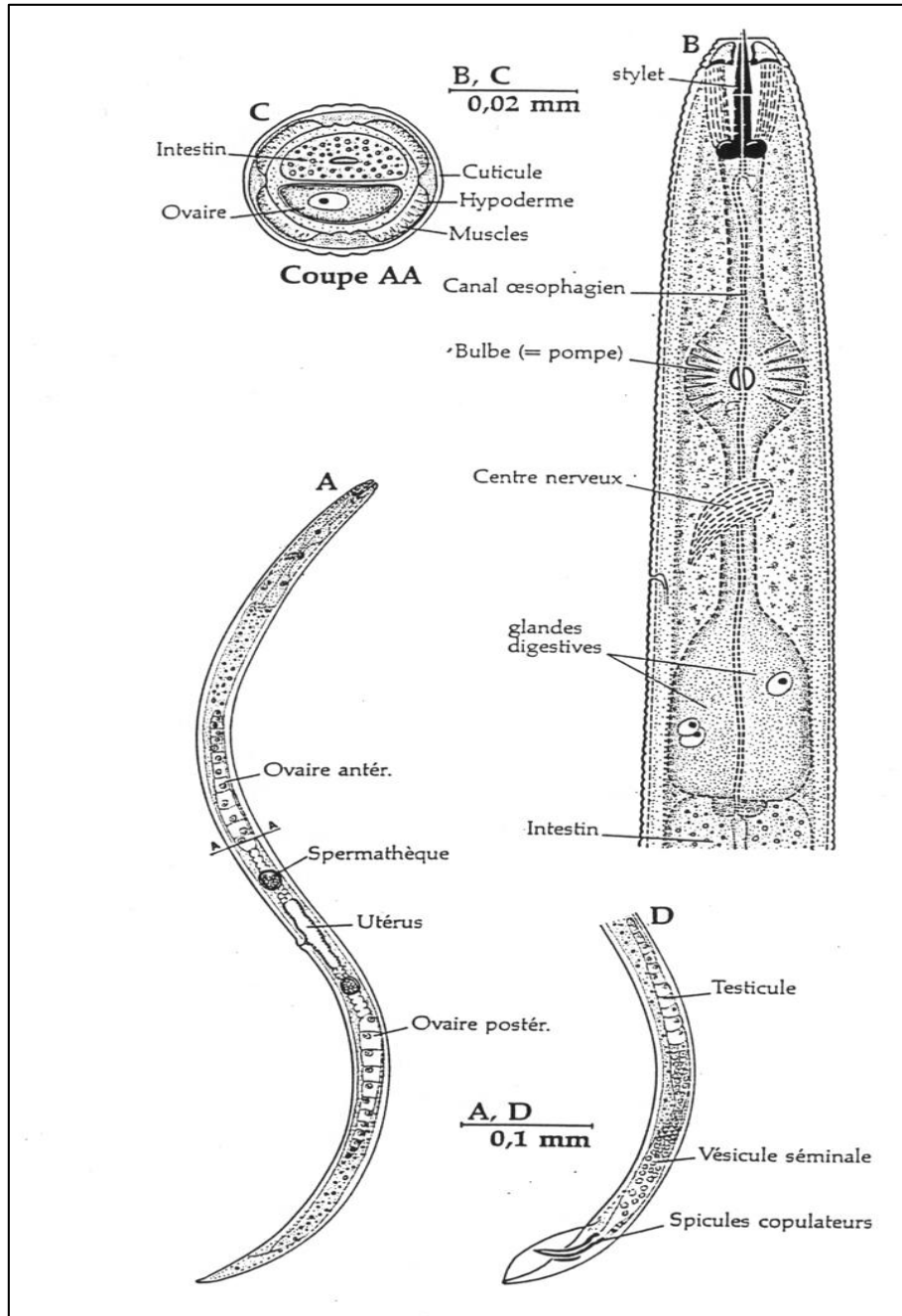


Figure 1 : Schéma de l'organisation d'un nématode parasite des plantes. A : femelle vue en entier. B : détail de la partie antérieure (région de l'œsophage). C : coupe dans la partie moyenne du corps. D : partie postérieure du mâle. [4]

### 2.1.1.2 Dégâts directs et indirects - Importance économique

Les attaques de nématodes peuvent être spectaculaires avec un fort pourcentage d'abaissement de récolte notamment en France pour *Heterodera avenae* sur céréales, *H. schachtii* sur betterave à sucre, *Meloidogyne* spp sur cultures maraîchères et fruitières ou *Globodera rostochiensis* sur pomme de terre. On les estimait à environ 100 billions de dollars par an en 1997[4], les nématodes étant considérés comme responsables de 10% des pertes de production dans le monde [5].

Il est toutefois difficile de chiffrer précisément les pertes que ces nématodes causent à l'agriculture. Celles-ci sont très variables selon l'espèce, la culture, les régions ou les années.

Le dommage est le plus souvent insidieux et peu visible, la végétation moins vigoureuse, la récolte réduite et pour les plantes pérennes, la longévité diminuée. Il est difficile d'estimer avec précision les dommages causés par une espèce particulière à une plante donnée car, très fréquemment, la plante héberge également divers autres nématodes phytoparasites.

Les dommages causés aux plantes et les baisses de rendements qui en résultent proviennent du mode d'alimentation des nématodes :

- 1) Ils détournent à leur profit une partie du métabolisme de la plante.
- 2) Ils endommagent le système racinaire de la plante par réductions et destructions des racines et des radicelles ce qui réduit l'alimentation en eau et en sels minéraux.
- 3) Ils injectent dans les cellules des sécrétions glandulaires destinées à liquéfier le contenu cellulaire avant de l'absorber. Ces sécrétions sont généralement toxiques pour les cellules et les tuent. Les **Trichodorus** parviennent ainsi à détruire totalement les zones de multiplication et d'élongation situées à l'apex des racines.
- 4) Les nématodes endoparasites sécrètent généralement des substances modifiant les cellules du cylindre central et du cortex provoquant la formation de cellules géantes ; ceci au-delà de la zone attaquée ce qui entraîne la formation de galles. Les cellules du cylindre central étant déformées, la circulation des sèves brute et élaborée est fortement perturbée.
- 5) Certains nématodes comme **Scutellonema cavenessi** gênent l'établissement des **Rhizobium** sur les racines des légumineuses privant ainsi ces plantes d'un apport substantiel d'azote.
- 6) Les nématodes appartenant aux genres **Trichodorus**, **Longidorus** et **Xiphinema** peuvent être des vecteurs de virus qu'ils injectent dans la plante en même temps que leur salive.

7) En s'insérant entre les cellules, en les perforant pour se déplacer et se nourrir, ils provoquent des lésions par lesquelles peuvent s'introduire d'autres agents pathogènes tels que champignons et bactéries.[6]

## 2.1.2 Les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*

### 2.1.2.1 Position systématique et répartition

Les *Meloidogyne* appartiennent à l'ordre des *Tylenchida* qui comprend une grande majorité de phytoparasites, au sous-ordre des *Tylenchina*, et à la famille des *Heteroderidae* qui regroupe les nématodes endoparasites sédentaires à kyste (genres *Heterodera* et *Globodera*) et à galles (*Meloidogyne* spp.).

Chez les nématodes à galles, la notion d'espèce peut être parfois assez floue, certaines espèces étant parthénogénétiques mitotiques strictes (*M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*...) d'autres amphimictiques (*M. carolinensis*, *M. megalyla* ...) et enfin d'autres se reproduisant par parthénogenèse méiotique facultative en absence de mâles (*M. hapla*, *M. chitwoodi*, *M. exigua* ...). Les descriptions morphologiques et/ou caryotypiques complétées par les outils de biologie moléculaire définissent les différentes espèces. Celles-ci sont représentées par différents isolats caractérisés par leur provenance géographique, leur hôte d'origine et parfois par leur aptitude à contourner des résistances bien identifiées (comme celle conférée par le gène *Mi* de la tomate). Les *Meloidogyne* constituent le groupe de nématodes le plus important par les dommages qu'ils provoquent à de très nombreuses cultures tropicales ou de climats chauds [7]. Cinquante-cinq espèces de ce genre ont été décrites mais seulement quatre d'entre-elles représentent 90% des dégâts causés au niveau mondial ; *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* et *M. hapla* sont en effet considérées comme les principales espèces du genre [8]. Les trois premières se rencontrent en régions chaudes ou méditerranéennes, sont regroupées sous l'appellation d'espèces du complexe polyphage des *Meloidogyne* et ont une gamme d'hôtes comprenant plus de 3000 espèces de plantes [9]. En France, elles se limitent, en plein air, aux régions méridionales mais peuvent causer des dommages sous serres ou tunnels en toutes régions. L'espèce *M. hapla* se développe quant à elle en zone tempérée.

### 2.1.2.2 Cycle de développement

Les *Meloidogyne* spp sont communément appelés les nématodes du nœud à galle (Root Knot Nematode RKN) en raison de leurs attaques caractéristiques des racines (figure 2).



**Figure 2 : Racines contenant des galle de porte-greffe pêcher(photo H Duval, INRA)**

Tous les *Meloidogyne* spp ont un cycle de vie similaire. Les œufs se trouvent à la surface des racines sous forme de masses gélatineuses orangées. Ils peuvent survivre dans le sol ou dans les résidus végétaux. Les larves (juvéniles ou J2) éclosent des œufs et avancent vers les racines situées à proximité. Les larves J2 pénètrent dans la racine en migrant vers le bas, entre les cellules du cortex et le méristème apical. Ils se déplacent ensuite vers le haut dans le cylindre vasculaire, induisant des cellules hypertrophiées multi-nucléées spécialisées connues sous le nom de cellules géantes. Ils deviennent sédentaires et se transforment en tiers enflé Juvéniles de quatrième étape. Enfin, ils se développent en femelles adultes, dont chacune peut pondre plus de 1000 œufs dans une masse d'œufs, souvent situé sur la surface extérieure de la racine (figure 3). Les cellules d'alimentation géantes et les divisions des cellules environnantes du parenchyme vasculaire donnent naissance aux galle racines typiques.[10]

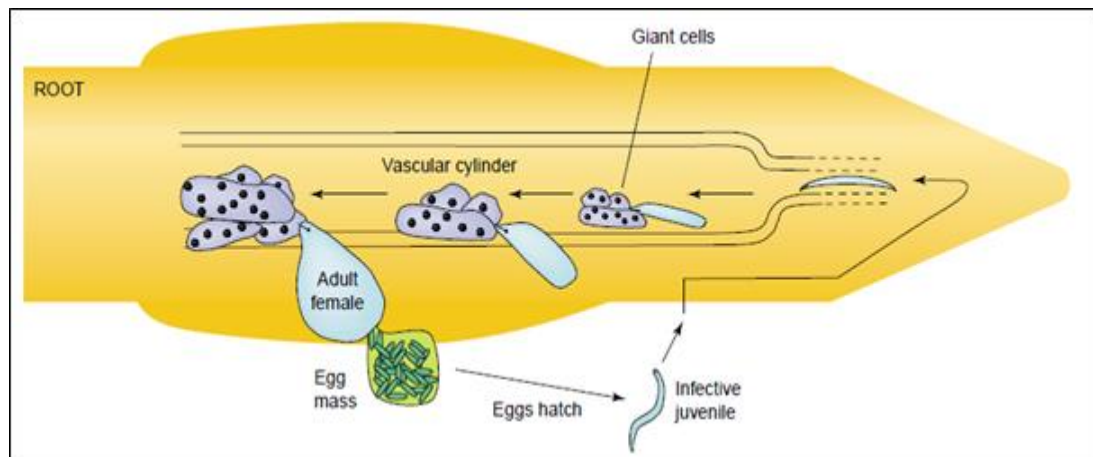


Figure 3 : Cycle de développement des nématodes à galles

### 2.1.2.3 Moyens de lutte contre les *Meloidogyne*

Le mode de vie souterrain des nématodes à galles, leurs caractères physiologiques, qui les rendent insensibles à beaucoup de substances toxiques et leurs formes de survie font qu'il est particulièrement difficile de mettre au point des méthodes pratiques de lutte. De plus, la très jeune larve représente la seule phase libre de l'espèce dans le sol.

Passé ce stade, les animaux se trouvent dans les tissus végétaux où ils sont parfaitement protégés et donc invulnérables à tout traitement classique non systémique.

La lutte chimique est en net recul en Europe et dans les pays industrialisés du fait du retrait de nombreuses molécules à forte toxicité pour l'homme et à fort impact environnemental. Parmi les solutions alternatives, les rotations culturales sont peu efficaces du fait de l'extrême polyphagie des espèces majeures de *Meloidogyne*. L'utilisation de champignons (*Arthrobotrys irregularis*, *Paecilomyces liacinus*, *Verticillium chlamydosporium*) ou de bactéries (*Pasteuria penetrans*) parasites de nématodes reste délicate du fait des coûts de production élevés des inoculums et de la difficulté à les intégrer durablement à des sols cultivés de façon intensive. Enfin des recherches orientées vers l'utilisation de plantes à vertu nématicide telles que les crotalaires, les tagètes ou le ricin n'ont pas encore débouché sur la commercialisation de nouvelles molécules actives plus spécifiques. [11] Rappelons également que, du fait que les nématodes aient une autonomie de déplacement limitée dans les sols, les méthodes prophylactiques restent particulièrement utiles même si elles sont insuffisantes. Au niveau de la parcelle contaminée, la meilleure alternative à la lutte chimique reste donc l'utilisation de variétés résistantes. Les nématodes sont en effet inféodés au sol et leur dispersion ne revêt pas un caractère épidémique comparable à celui des parasites ou agents pathogènes aériens. De plus, le mode de reproduction par parthénogénèse mitotique des espèces qui ont la plus forte incidence économique devrait limiter les risques de contournement. [4]

#### 2.1.2.4 La résistance des plantes aux nématodes

Les parades développées par les plantes vis-à-vis des nématodes phytoparasites sont probablement au moins aussi variées que les stratégies parasitaires développées par ces derniers. Quand l'ensemble d'une espèce végétale donnée est insensible à un nématode, celle-ci est considérée comme non hôte. Quand certaines variétés ou populations d'une espèce hôte présentent une incompatibilité avec un nématode, on parle de résistance, celle-ci pouvant être totale ou quantitative. Une des premières armes dont peut disposer la plante contre les nématodes phytoparasites est simplement d'échapper à la perception (ou à la reconnaissance) par les nématodes via les exsudats racinaires. Il est cependant difficile de démontrer une telle stratégie, les racines étant aussi suspectées d'exsuder des substances répulsives voire nématocides (*in vitro*) comme dans le cas des tagètes, de l'ail, de l'oignon ou des asperges. Si les barrières physiques (cuticules et parois cellulaires) opposées par la plante à la pénétration des nématodes semblent inefficaces, différents mécanismes de résistance peuvent intervenir après leur pénétration. Le mécanisme le plus couramment associé à la résistance aux nématodes endoparasites est la réaction hypersensible (HR) : celle-ci se traduit par une nécrose des cellules directement en contact avec le nématode (cellules épidermiques, corticales ou du protoxylème) ou en contact avec les cellules géantes. Ces nécroses, probablement associées à la synthèse de lignines, de callose, à la production de phytoalexines, de protéines de défense de type PR (pathogenesis related), d'inhibiteurs de protéases, voire de chitinases peuvent bloquer et tuer le nématode au cours de sa migration ou de son développement selon le stade où elles interviennent. Cependant en l'absence de nécroses cellulaires, des larves L2 de *M. incognita* peuvent être bloquées au niveau de l'apex racinaire du fait d'une impossibilité à pénétrer les jeunes tissus vasculaires chez des plants de luzerne résistants. L'expérience de Sawhney et Webster (1979) nous renseigne aussi sur le rôle relatif de la réaction hypersensible dans la résistance de tomates porteuses du gène *Mi* à *M. incognita* : en inhibant partiellement la synthèse protéique de racines de tomates avec du cycloheximide, ceux-ci sont parvenus à inhiber la réaction hypersensible visible chez des plants de tomates résistants, sans pour autant inhiber totalement la croissance racinaire (ni la formation des galles chez des plants sensibles). Cette expérience a montré qu'en l'absence de réaction hypersensible les plants résistants le demeuraient, les larves quittant les racines après leur pénétration. Ceci nous rappelle que la réaction hypersensible définie par la nécrose cellulaire rapide n'est qu'un outil supplémentaire dont disposent les plantes en réponse aux pathogènes et qu'elle dépend, ainsi que d'autres réactions, d'une reconnaissance du pathogène plus fondamentale. Enfin des larves quittant les racines après leur pénétration ont aussi été observées pour des variétés résistants de luzerne. [4]



## 2.2 Les espèces du genre *Prunus*

Les *Prunus* comprennent les espèces fruitières à noyau : les pruniers, les abricotiers, les pêchers, les amandiers et les cerisiers, dont les fruits ou l'amande sont consommés à travers le monde, frais, séchés ou transformés. Les productions mondiales annuelles de pêches, prunes, abricots, cerises et amandes pour 2003 sont résumées dans le Tableau 1.[4]

Tableau 1 : Production mondiale (en tonnes) et répartition géographique de fruits issus des *Prunus* comparées aux productions de pommes et poires pour l'année 2003 (source : FAO)

|                   | Monde      | Europe     | Amérique du Nord et Centrale | Amérique du Sud | Asie       | Afrique   |
|-------------------|------------|------------|------------------------------|-----------------|------------|-----------|
| Pêche & nectarine | 14 787 539 | 4 170 243  | 1 649 793                    | 821 292         | 7 359 768  | 687 117   |
| Prune             | 10 109 515 | 3 448 206  | 802 722                      | 373 130         | 5 269 051  | 190 256   |
| Abricot           | 2 529 259  | 739 726    | 92 129                       | 47 465          | 1 276 638  | 348 801   |
| Cerise            | 1 872 436  | 938 967    | 223 466                      | 41 083          | 652 600    | 8 931     |
| Cerise acide      | 1 054 894  | 733 695    | 107 899                      | -               | 213 300    | -         |
| Amande            | 1 679 444  | 366 709    | 741 500                      | 9 580           | 389 517    | 152 638   |
| Pomme             | 57 967 289 | 16 848 526 | 4 959 045                    | 3 267 212       | 30 534 505 | 1 576 809 |
| Poire             | 17 191 205 | 3 421 750  | 884 630                      | 823 274         | 11 290 265 | 581 390   |

### 2.2.1 Classification et origines du genre *Prunus*

Le genre *Prunus* appartient à la sous-famille des Prunoideae (Figure 4) parmi laquelle il constitue le groupe principal et le plus diversifié avec près de 400 espèces. Les Amygdaloideae appartiennent à la famille des Rosacées et à l'ordre des Rosales.

Dans la classification de Rheder (1940), le genre *Prunus* est divisé en cinq sous-genres :

- Amydalus : celui-ci comprend des espèces diploïdes : le pêcher (*P. persica*), l'amandier (*P. dulcis*) et des espèces sauvages (*P. davidiana*, *P. mira*) ;
- Prunophora : celui-ci comprenant le groupe des pruniers hexaploïdes (*P. domestica*, *P. insititia*), tétraploïdes (*P. spinosa*), ou diploïdes (*P. cerasifera*, *P. salicina*) et celui des abricotiers (*P. armeniaca*, *P. mume*, *P. brigantina*) ;
- Cerasus : il regroupe les merisiers (*P. avium*) et les cerisiers (*P. cerasus*) ;
- Laurocerasus et Padus : ces sous-genres comprennent des espèces sauvages et ornementales.

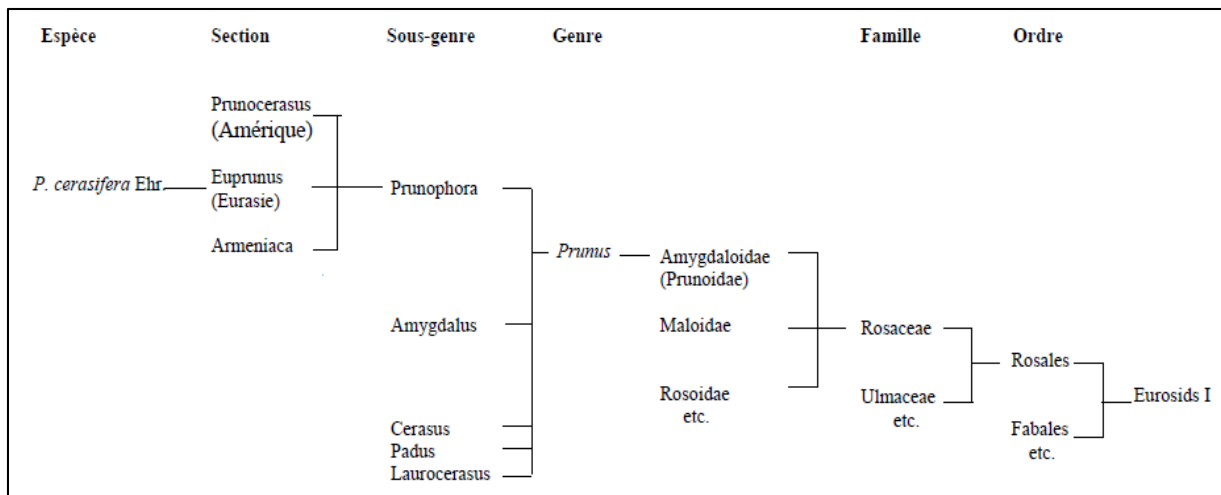


Figure 4: Classification du prunier myrobolan (*P. cerasifera*) du genre *Prunus* et, d'après Redher (1954)[4]

## 2.2.2 Données génétiques et moléculaires

Les espèces du genre *Prunus* forment une série polyploïde de  $2n = 16$  à  $6n = 48$  dans laquelle tous les niveaux intermédiaires de ploïdie sont représentés notamment dans les espèces matériel utilisées comme porte-greffe [12]. Le génome diploïde est relativement petit. Chez le pêcher (*P. persica*), il a été estimé à 230 méga de base [13].

Les pêchers et certaines variétés de pruniers et d'abricotier sont des autogames préférentiels tandis que l'amandier, le cerisier doux et d'autres variétés de pruniers (notamment le prunier myrobolan) sont autostériles par auto incompatibilité gamétophytique ou parfois par stérilité mâle. L'existence de nombreux croisements interspécifiques naturels ainsi que l'hétérozygotie de la plupart des espèces ont permis le maintien d'une importante variabilité génétique des espèces dans leurs régions d'origine. L'hybridation interspécifique se produit parfois, de manière spontanée, surtout entre espèces appartenant au même sous-genre. C'est le cas par exemple des pêchers et des amandiers (sous-genre *Amygdalus*) ou des différentes espèces de pruniers (sous-genre *Prunophora*) (Layne and Sherman, 1986). L'isolement géographique originel des espèces (notamment entre pêchers et amandiers) et l'échelonnement naturel des périodes de floraison selon les espèces (cas des *Prunophora*) expliquent probablement l'absence de barrière génétique inter-spécifique autorisant la fertilité de certains hybrides.[4]



## 2.3 Les gènes de résistance

### 2.3.1 Introduction

Pour lutter contre les défis constants des agents pathogènes, les plantes ont développé un système sophistiqué de défense à deux couches, dans lequel les protéines codées par les gènes de résistance aux maladies (R) permettent de détecter les signaux d'invasion des agents pathogènes et d'obtenir des réponses de défense.

Plus de 140 gènes R ont été caractérisés à partir de différentes plantes à fleurs (Liu et al., 2007 ; Yang et al., 2013), ce qui confère une résistance à un large éventail d'agents pathogènes, y compris les bactéries, les champignons, les oomycètes, les virus et les nématodes. [14]

### 2.3.2 Les NBS-LRR

La grande majorité des gènes de résistance identifiés appartiennent à la famille des Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat(NBS-LRR). Une étude récente du génome d'*A. thaliana* en dénombre environ 149 [15]chez cette plante, répartis approximativement en 93 TNLs et 50 CNLs. Au niveau du génome, ces gènes se répartissent généralement en cluster pouvant comporter de nombreuses copies en tandem, même si l'on trouve aussi des copies isolées. Structurellement, ces gènes ont en commun de posséder un domaine NBS (ou, plus spécifiquement, NB-ARC) capable de fixer et d'hydrolyser l'ATP (démonstré pour les gènes *Mi-1* et *I2*), et un domaine LRR possédant des résidus hypervariables et impliqués dans la spécificité des interactions. D'une manière générale les NBS-LRR sont classés en deux familles structurellement distinctes selon la nature de leur extrémité N-terminale :

- Les TNL (TIR-NBS-LRR) possédant un domaine N-terminal TIR ;
- Les CNL (coiled coil-NBS-LRR) possédant une structure de type coiled-coil (ou CC, structure en épingle super-enroulée) à leur extrémité N-terminale. A cette dernière famille sont classiquement rattachés les « non TIR-NBS-LRR » pour lesquels une structure de type coiled-coil en position N-terminale ne peut être véritablement définie.

#### 2.3.2.1 Le domaine NBS (ou NB-ARC)

Ce domaine est souvent présent dans des protéines dont l'activité nécessite la fixation d'ATP ou de GTP, telles que les ATP synthases ou les facteurs d'élongation (GTPase).

Le motif NBS (320 résidus environ) se caractérise par la présence d'un domaine kinase aussi appelé P-loop (pour phosphate-binding loop), d'un domaine hydrophobe (de séquence GLPL, GNLPL ou SGNLPL) [15]et des domaines kinase 2 et 3a.

Le motif kinase 2 est supposé lier un ion métallique  $Mg^{2+}$  nécessaire au transfert du phosphore tandis que le motif kinase 3a interagirait avec la base purique de l'ATP.

Chez *A. thaliana*, ils définissent au total 8 motifs conservés dans le domaine NBS de l'ensemble des gènes de résistance du génome.

### 2.3.2.2 Le domaine LRR

Ces domaines sont composés de 24 à 26 acides aminés, répétés de 1 à 40 fois. Comme leur nom l'indique, ces domaines sont riches en leucine ou en autres acides aminés hydrophobes et contiennent également des résidus proline et asparagine, régulièrement espacés.

Deux types de motifs LRR ont été décrits : Les LRR extra cytoplasmiques et les LRR cytoplasmiques.

Les motifs LRR retrouvés à la fois dans le règne végétal et animal sont souvent impliqués dans les interactions protéine-protéine. Ils interviennent par exemple dans les interactions enzyme-inhibiteur (RNase et inhibiteur de RNase), dans la fixation d'hormones sur des récepteurs transmembranaires ou dans la cascade de transduction d'un signal.

Des motifs LRR des gènes de résistance des plantes sont parfois décrits comme atypiques ou peu conservés.[16]

### 2.3.2.3 Le domaine TIR

Chez les plantes, ce domaine est vu comme un module de signalisation, capable d'hétérodimérisation dans des interactions TIR/TIR, via ses domaines très conservés, et d'homodimérisation, voire de liaison avec des produits dérivés des pathogènes, via ses domaines variables. Ce domaine pourrait donc servir au recrutement de protéines adaptatrices ou effectrices porteuses d'un domaine TIR. Il pourrait aussi intervenir sur la spécificité de la résistance induite, comme dans le cas des allèles du gène *L* du lin différencié uniquement par leurs domaines TIR et fonctionnels vis-à-vis d'isolats différents.

Enfin, un contrôle négatif de l'activité du domaine TIR semble exister : en effet l'expression hétérologue de différents allèles du gène *L* (*L2*, *L6*, *L10*) du lin chez le tabac a montré, outre un phénotype de type « gain de fonction » dans le cas de l'allèle *L6*, que l'expression d'un allèle *L10* complet associée à celle d'un allèle *L10* tronqué après les 39 premiers codons du NBS (et donc essentiellement son domaine TIR) conférait aussi un phénotype à « gain de fonction »[17]. L'expression transitoire du domaine TIR de l'allèle *L10* par agro-infiltration de feuilles de tabac a ensuite montré que celui-ci induisait une forte réaction de mort cellulaire[18]

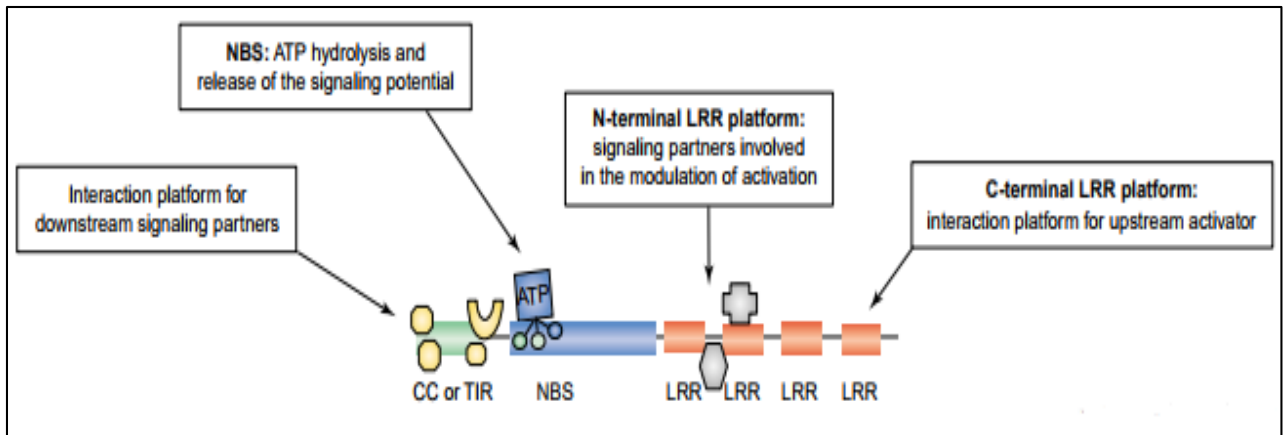


Figure 5 : schéma récapitulatif du rôle de chaque domaine

### 2.3.3 Les gènes de résistance chez les Prunus

Parmi les nombreuses variétés existantes au sein de ce genre, des espèces résistantes aux nématodes ont déjà pu être observées, d'abord sur le plan phénotypique, puis par cartographie et enfin par découverte des gènes de résistance. Certains gènes offrent une protection contre tous les types de nématodes à galles (*M. incognita*, *arenaria* et *javanica*) comme le gène *Ma* découverte chez le prunier myrobolan (*P. cerasifera*) tandis que d'autres offrent un spectre de résistance plus restreint tel que *RMja* que l'on trouve chez l'amandier *Alnem1* et protégeant contre *M.arenaria* et *M.javanica*. Le gène *RMia*, quant à lui, empêche les infections par *M. incognita* et *M. arenaria*. Tous ces gènes de résistance sont des gènes dominants.[19] . Le tableau 2 montre le spectre de résistance de ces trois gènes chez les trois espèces Prunus.

Tableau 2 : Spectre de résistance aux *Meloidogyne* des sources *Prunus* du projet et des trois gènes majeurs correspondants et spectre attendu par pyramidage dans un exemple du type 'hybride 3-voies'. R, résistant ; S, sensible [20]

| Porte-greffe  | <i>M. arenaria</i>    | <i>M. incognita</i> | <i>M. javanica</i> | <i>M. floridensis</i> |
|---|-----------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| Pêcher, amandier ou prunier communs                   | S                     | S                   | S                  | S                     |
| <b>Sources de résistance</b>                          |                       |                     |                    |                       |
| Prunier myrobolan<br>P.2175                           | ← R R <i>Ma</i> R R → |                     |                    |                       |
| Pêcher<br>Nemared                                     | ← R <i>RMia</i> R →   |                     | R/S                | S                     |
| Amandier<br>Alnem1<br>Alnem88                         | ← R ? →               | S                   | ← R <i>RMja</i> →  | S                     |
| <b>Hybride 3-voies</b><br>P.2175 x<br>Alnem x Nemared | ← <i>RMia</i> →       |                     | ← <i>RMja</i> →    | ← <i>Ma</i> →         |

# 3

## Matériel et Méthodes

## 3.1 Matériels

### 3.1.1 Matériel végétal

Au cours de ce stage nous avons utilisé plusieurs variétés de Myrobolan, pêcher, Abricotier et d'Amandier Les deux tableaux suivants listent ces variétés.

Tableau 3 : Liste des variétés de la collection *Prunus* utilisés pour étudier le polymorphisme du gène *Ma*.

| Code INRA | Espèce                | Nom variété           |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| B29       | armeniaca             | Yalta                 |
| B17       | cerasifera            | Pissardi 105- 13      |
| P2032     | cerasifera            | Myrabi                |
| P2828     | cerasifera            | Myro Iran Rouge       |
| P3172     | pumila                | Myruni                |
| S2535     | persica               | Chulla Nam Do         |
| P2980     | cerasifera            | Myrotop®              |
| P1090     | cerasifera            | Myrocal®              |
| A1236     | armeniaca             | Manicot               |
| B29       | armeniaca             | Yalta                 |
| P3170     | tomentosa             | Weito T6              |
| P3871     | cerasifera x persica  | Krymsk 86             |
| B11       | americana             | P americana 114- 9    |
| B24       | subcordata            | Prunus subcordata 4   |
| GF31      | cerasifera x salicina | GF31                  |
| P2037     | besseyi               | Semis de P besseyi    |
| P1908     | dauidiana             | Prunus dauidiana n°4  |
| B10       | dauidiana             | Prunus dauidiana 3    |
| B13       | cerasifera            | Korolkowii 105-9      |
| P16       | cerasifera            | P16-5                 |
| P34       | cerasifera            | P34-16                |
| P855      | cerasifera            | Castelmoron           |
| P1079     | cerasifera            | Myro poupre           |
| P1090     | cerasifera            | Myrocal®              |
| P1254     | cerasifera            | P1254                 |
| P2175     | cerasifera            | Myro P2175            |
| P2550     | cerasifera            | Myro purpusi          |
| P2646     | cerasifera            | Myro Magda Jensen     |
| P2792     | cerasifera            | Purpurovaya           |
| P2823     | cerasifera            | Myro Iran n°3         |
| P2825     | cerasifera            | Myro Iran gros fruits |
| P2826     | cerasifera            | Myro Iran Sarde       |
| P2924     | cerasifera            | Purpurovaya FL (2x)   |
| P2932     | cerasifera            | Altos                 |
| P2933     | cerasifera            | Kablechkovo-PF        |
| P2935     | cerasifera            | Myro pg pêcher-2      |
| P2980     | cerasifera            | Myrotop®              |

| Code INRA | Espèce     | Nom variété              |
|-----------|------------|--------------------------|
| P2934     | cerasifera | Myro pg pêcheur-1        |
| P2985     | cerasifera | Myro pg am-7             |
| P3206     | cerasifera | Sogdijskaja              |
| P3439     | cerasifera | Mykla                    |
| P3440     | cerasifera | MYVS 1                   |
| P3443     | cerasifera | Adara                    |
| P3615     | cerasifera | Hamyra                   |
| P3668     | cerasifera | Myro compatible cerisier |
| P3862     | cerasifera | Myrobolan 29C            |
| P3890     | cerasifera | (P2175xP2934)29          |
| P3891     | cerasifera | Myro de Lesdain(P5004)   |
| J23       | salicina   | Ozark premier            |
| J114      | salicina   | Toka                     |
| J222      | salicina   | Fabre                    |
| J265      | simonii    | P. simonii °15           |
| B18       | cerasifera | pissardi 105- 14         |
| P18       | cerasifera | Myrobolan B              |
| P1993     | cerasifera | Myro 4001                |

Tableau 4 : Liste des variétés de *Prunus* reséquencées (NGS illumina) et analysées pour l'étude du le polymorphisme du gène Ma

| Espèce                         | Nom Usuel        | Variété                        |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| <i>Prunus cerasifera</i>       | Myrobolan        | P1079                          |
| <i>Prunus cerasifera</i>       | Myrobolan        | P2175                          |
| <i>Prunus armeniaca</i>        | Abricotier       | Bergeron                       |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | Rubira                         |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | Pamir                          |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | Montclar                       |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | Nemared                        |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | zephir                         |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | Summergrand                    |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | Malokonare                     |
| <i>Prunus persica</i>          | Pêcheur          | Pleureur                       |
| <i>Prunus dulcis</i>           | Amandier         | Lauranne                       |
| <i>Prunus dulcis</i>           | Amandier         | Dorée                          |
| <i>Prunus dulcis</i>           | Amandier         | Ferrastar                      |
| <i>Prunus dulcis</i>           | Amandier         | Princesse                      |
| <i>Prunus dulcis</i>           | Amandier         | A la Dame                      |
| <i>Prunus dulcis</i>           | Amandier         | Pointue d'Aureille             |
| <i>P,Fenzliana*P,bucharica</i> | Amandier sauvage | <i>P,Fenzliana*P,bucharica</i> |
| <i>Prunus webbii</i>           | Amandier sauvage | <i>Prunus webbii</i>           |
| <i>Prunus bucharica</i>        | Amandier sauvage | <i>Prunus bucharica</i>        |
| <i>Prunus kuramica</i>         | Amandier sauvage | <i>Prunus kuramica</i>         |
| <i>Prunus dulcis</i>           | Amandier         | Alnem                          |

### 3.1.2 Appareils utilisés

Les appareils utilisés pendant notre travail sont les suivantes :

- La Centrifugeuse au niveau de l'extraction de l'ADN
- Le Thermocycleur pour la PCR
- Le Vortex pour l'homogénéisation des réactifs
- La Thermo-soudeuse afin de bien sceller la plaque pour éviter la vaporisation des solutions au niveau du thermocycleur à cause des températures élevées.
- Les micropipettes multicanaux électronique.

## 3.2 Méthodes

### 3.2.1 Partie moléculaire

#### 3.2.1.1 Extraction D'ADN

Le protocole utilisé est « extraction d'ADN en plaque 96 puits » de Christelle Troadec UMR INRA 1165 CNRS 8114 UEVE ; protocole inspiré du Dneasy kit de Quigen (voir annexe1). L'ADN est extrait à partir des feuilles.

#### 3.2.1.2 PCR

##### La réaction de PCR

Dans une plaque PCR, nous mélangeons dans chaque puit :

- ADN 2 $\mu$ l
- Mélange de dNTP 4mM 0, 75 $\mu$ l
- Amorces 20  $\mu$ M 0, 2 $\mu$ l forward + 0, 2 $\mu$ l reverse
- Taq polymérase 5 U/ $\mu$ l 0, 05 $\mu$ l
- Tampon 5x de la Taq polymérase buffer 3 $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM 0, 9 $\mu$ l
- H<sub>2</sub>O 7 $\mu$ l

Le cycle PCR utilisé est le suivant :

- Une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes.
- Une étape d'hybridation pendant 30 secondes à une température d'annealing variable selon les amorces variant entre 55°C et 63°C.
- Une étape d'élongation à 72°C pendant 45 secondes.

Ce cycle est répété 35 fois.

### 3.2.1.3 Analyse de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

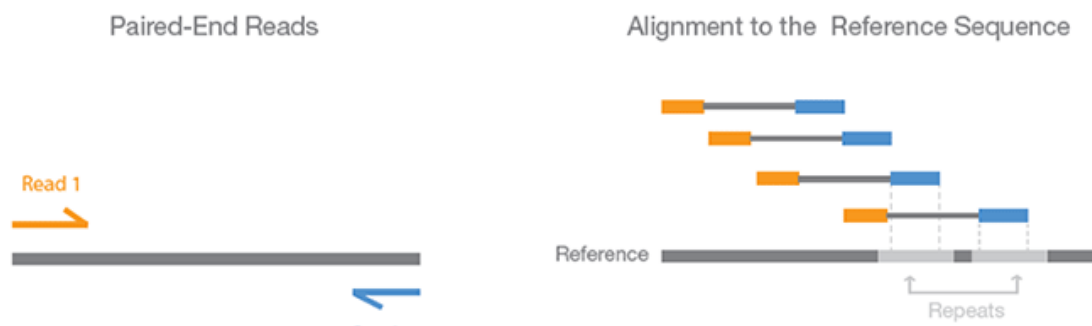
Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargées, nous pouvons donc les faire migrer dans un champ électrique.

Les échantillons d'ADN sont mélangés avec 5 µl du volume de tampon vert et la migration est ensuite effectuée à 130 volts, 200 mA.

Après migration, la visualisation de l'ADN se réalise grâce à la présence du BET qui est un colorant fluorescent. En effet on immerge le gel dans un bain de BET pendant quelque minute (10min). Du fait de la planéité de sa structure, le BET possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques, où sa fluorescence dans le visible est exaltée. Elle est révélée par excitation sous illumination par UV courts (vers 300nm) en plaçant le gel sur le transilluminateur. L'ADN coloré montre ainsi une fluorescence.

### 3.2.1.4 Séquençage des fragments d'ADN

Après vérification sur gel, les produits de PCR sont envoyés à la firme privée MWG pour le séquençages Sanger paired-end.



### 3.2.1.5 Génotypage par marqueur kasp®

La chimie KASPar permet de réaliser du génotypage SNP en simplex. Elle repose sur l'utilisation d'assays comprenant 3 amorces ; 2 étant allèles spécifiques et l'autre commune. L'amplification spécifique de chaque allèle est alors couplée à une émission de fluorescence particulière. La fluorescence est détectée par l'appareil de lecture de la société Perkin Elmerle via un protocole de lecture en point final, permettant d'acquérir les données de génotypage. Le protocole est détaillé dans l'annexe (annexe 5).



### 3.2.2 Analyse bio-informatique

L'analyse des séquences est faite en plusieurs étapes en utilisant plusieurs sources de données et des logiciels de bio-informatique. Le schéma qui suit illustre ces étapes.

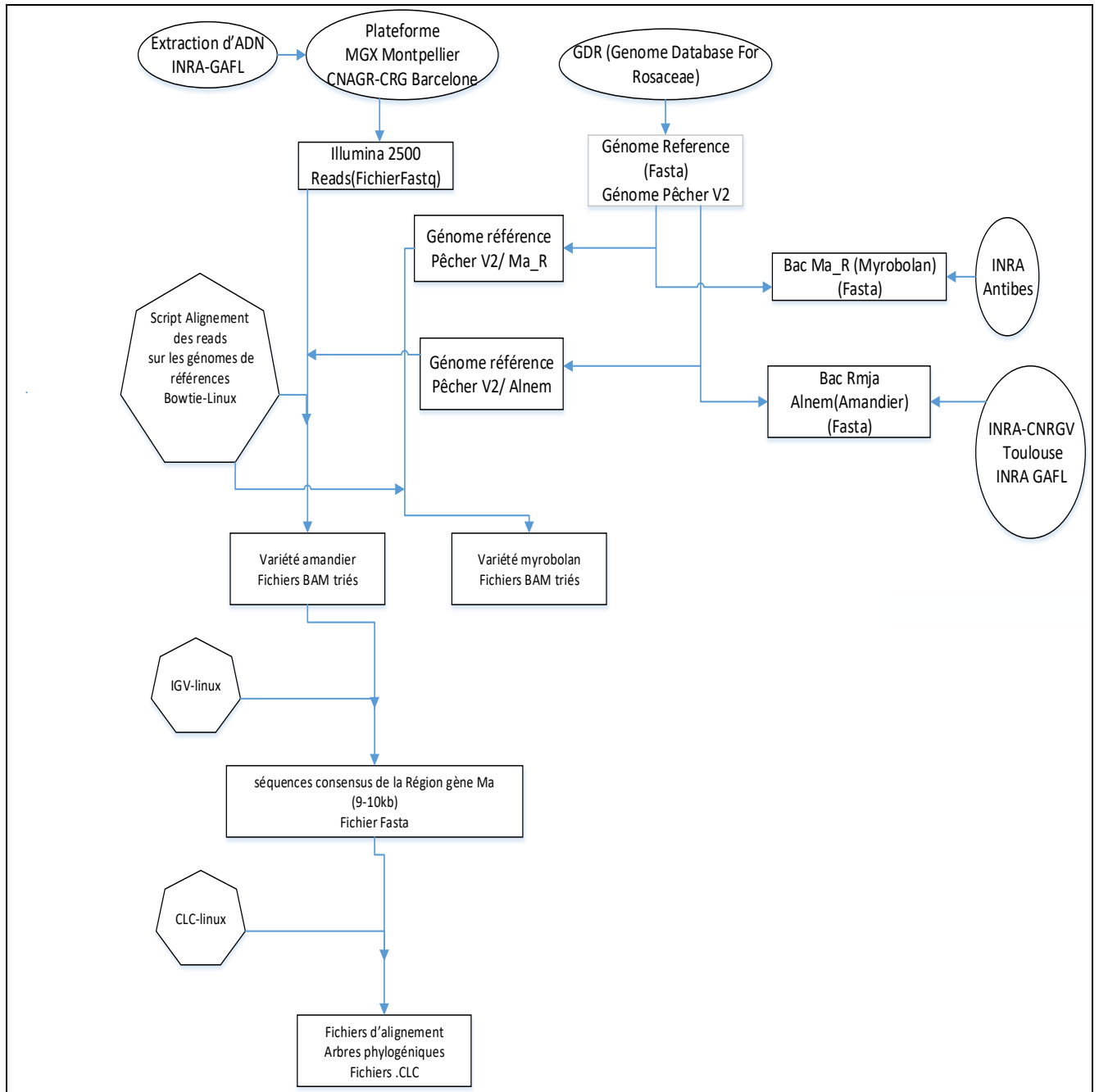


Figure 6 : Diagramme d'étapes d'analyse des séquences

### 3.2.2.1 Intégration des séquences issues de banque bac dans le génome de référence

Les séquences des bacs 76H19 et 40K9 téléchargés du site web NCBI (figure 7) et celle du bac Alnem obtenue du CNRGV Toulouse, ont été substitués dans le génome de référence pêcher.

On applique le même principe sur ces 3 bacs en créant sous linux des séquences patch : on blaste d'abord le bac sur le génome de référence pêcher V2 (téléchargé de GDR : Genome Database for Rosaceae), on détecte les positions de début et de fin du BAC sur la référence V2 et ensuite on au niveau de cet intervalle, on enlève la séquence V2 et on insère la séquence du bac (figure 8).

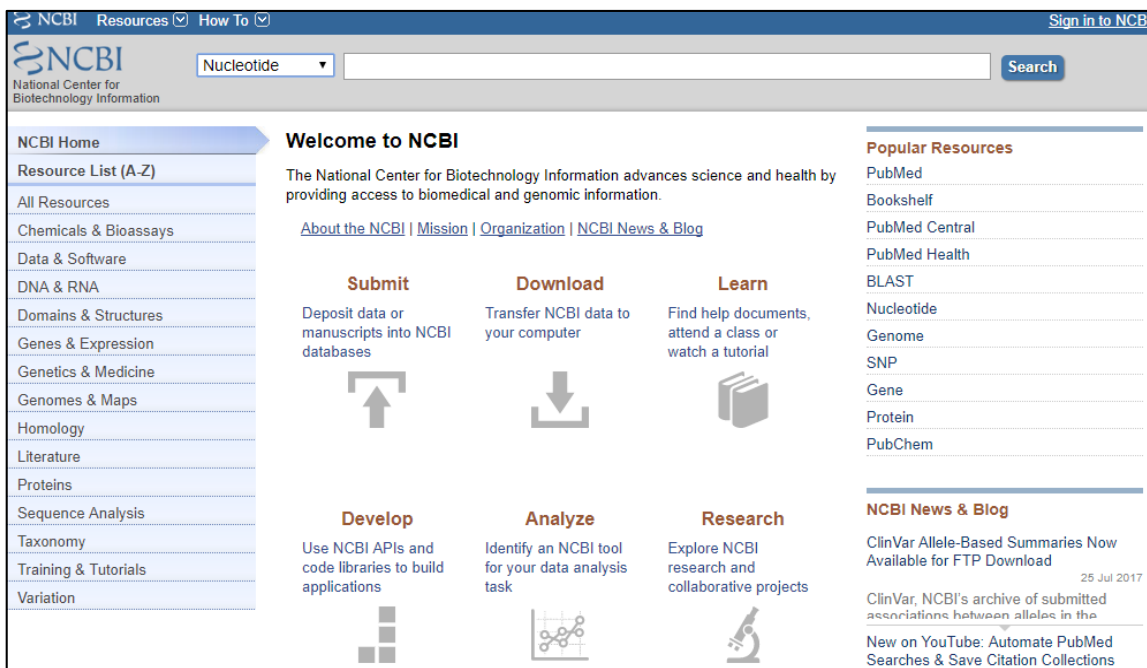


Figure 7 : Interface de site NCBI

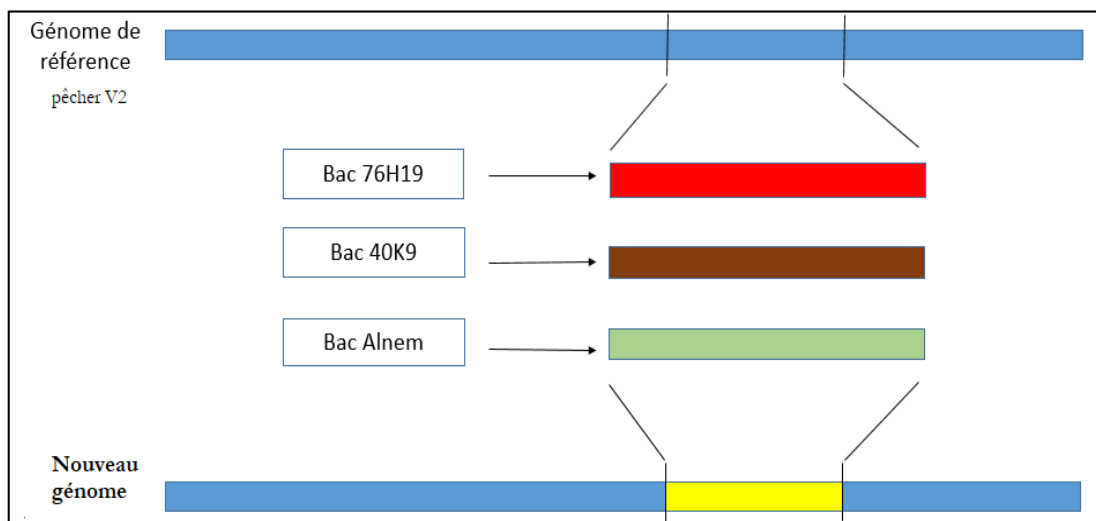


Figure 8: schéma explicative de l'intégration du bac dans le génome de référence

### 3.2.2.2 Alignement des séquences NGS illumina sur les nouvelles références

L'alignement des séquences NGS illumina sur les nouveaux génomes de référence se fait à partir de programmes sous linux dont les scripts sont détaillés en annexe sous linux (annexe 3)

### 3.2.2.3 Obtention des séquences consensus du gène Ma (IGV)

Afin de faire la comparaison des séquences du gène Ma nous devons extraire ces séquences d'intérêt. Cela est fait en utilisant le logiciel IGV par extraction d'une séquence consensus qui est alignée sur le gène Ma de la nouvelle séquence de référence.

Ensuite sous linux nous utilisons le logiciel IGV et nous mettons notre séquence de référence et par la suite nous alignons nos reads.

On repère la zone qui encadre le gène Ma et on extrait notre séquence consensus (figure10).

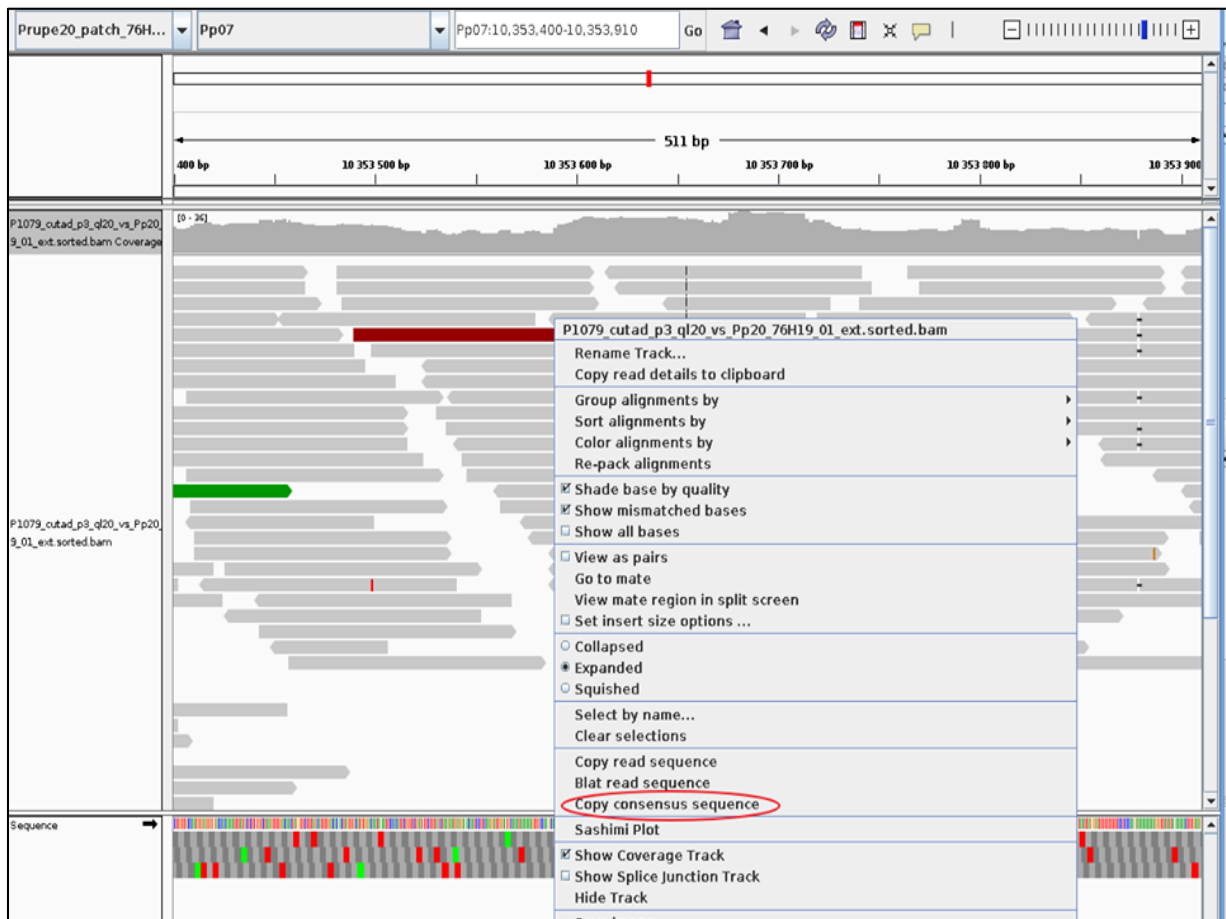


Figure 9 : obtention du séquence consensus

### 3.2.2.4 Alignement des séquences consensus

L'alignement des séquences consensus se fait avec le logiciel CLC en suivant les étapes suivantes :

- Importer des séquences consensus sous CLC en cliquant sur file import puis standard import (figure 10)

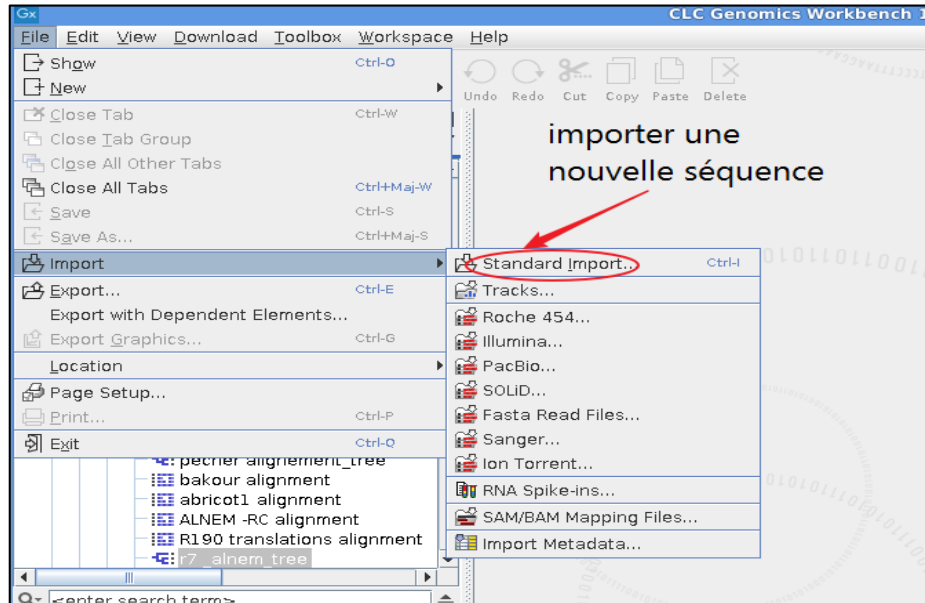


Figure 10 : importation des séquences

- Aller à la barre d'outil et cliquer sur toolbox après classical sequence analysis alignment and trees et enfin create alignment puis sélectionner les séquences dont on veut faire l'alignement (figure11)

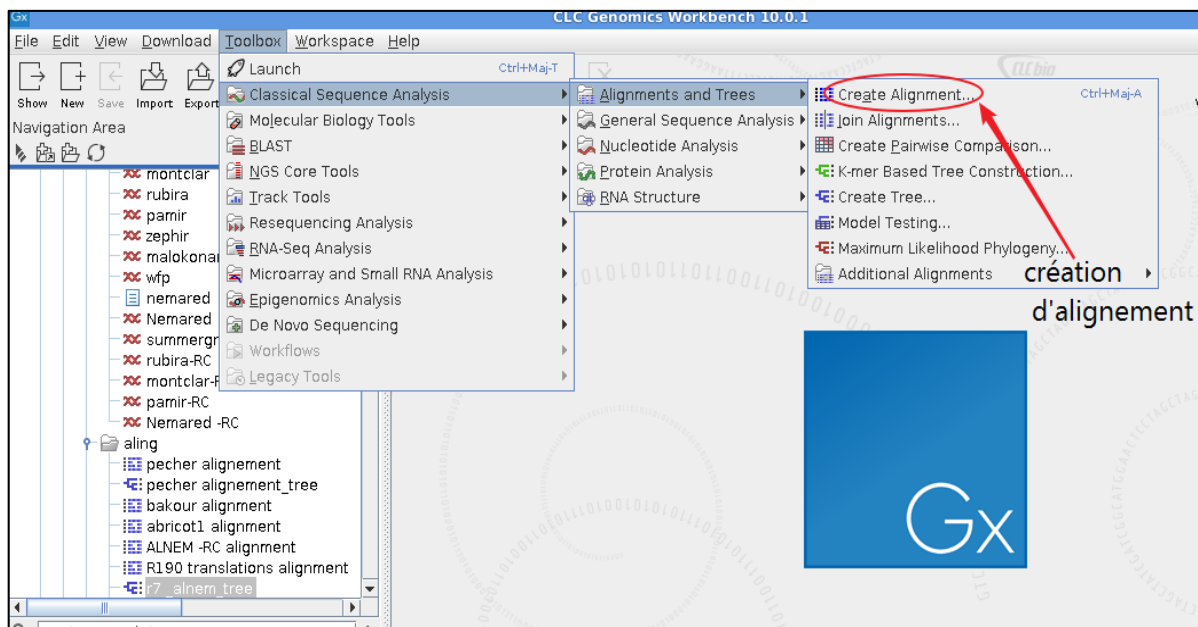


Figure 11 : alignement des séquences

Si les séquences ne sont pas dans le même sens il faut faire avant l'alignement la reverse complémentaire de la séquence afin d'avoir un alignement parfait (figure 12).

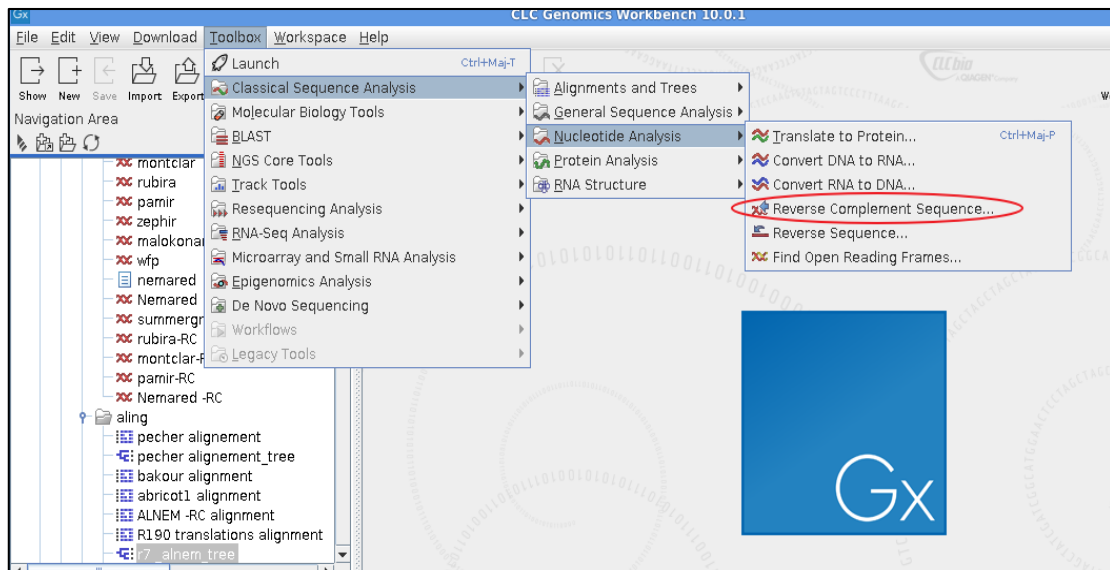
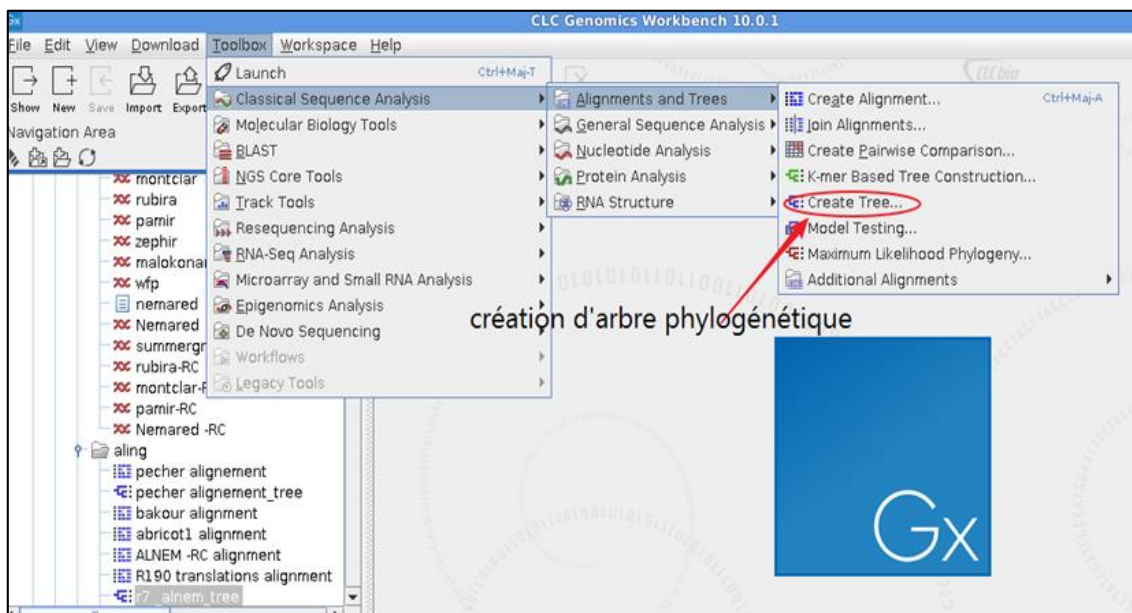


Figure 12 : création de séquence reverse

### 3.2.2.5 L'arbre phylogénétique

La création de l'arbre phylogénétique se fait à partir des séquences alignées. Le schéma qui suit résume les étapes de création de l'arbre par CLC.



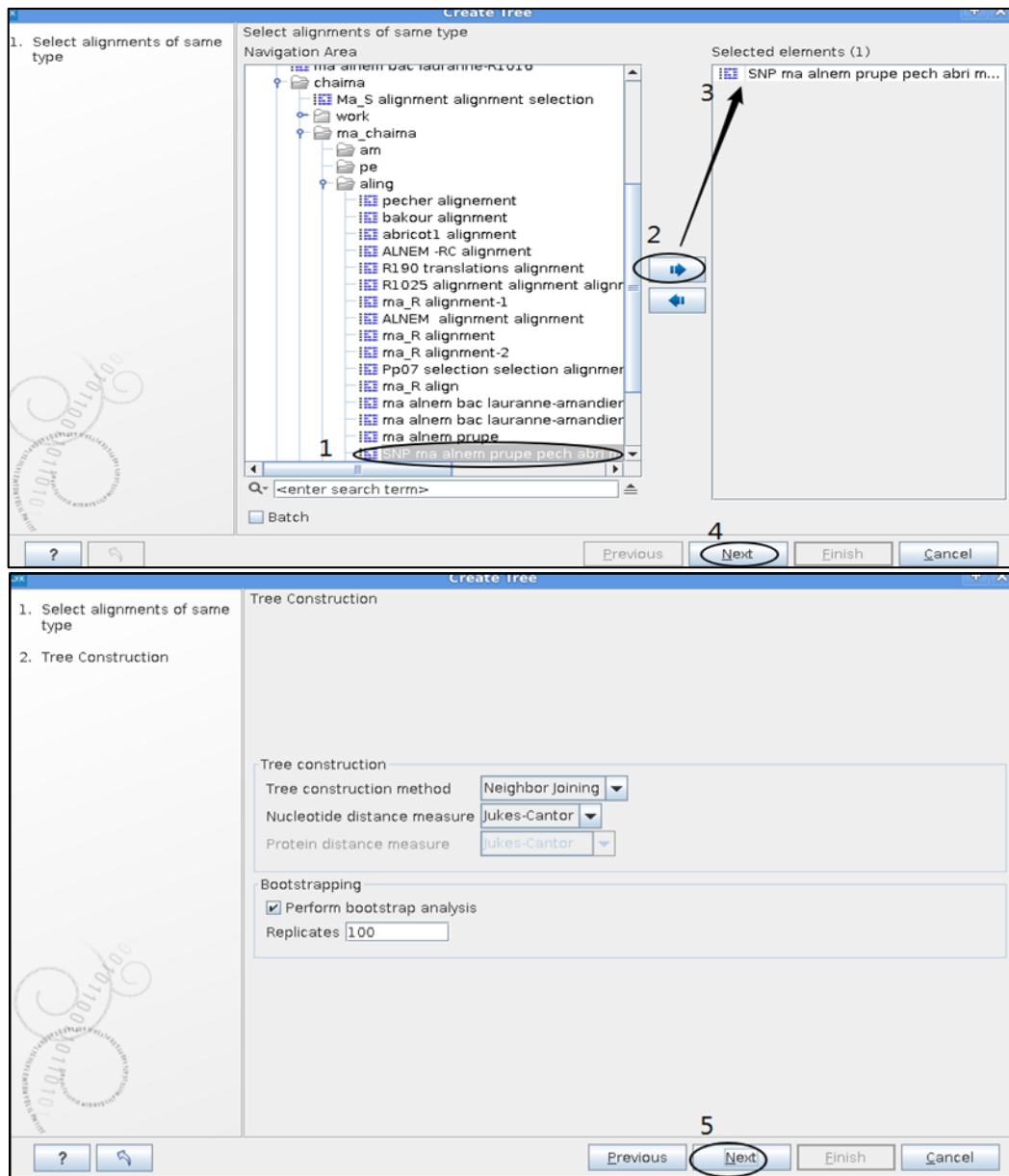


Figure 13 : les étapes de création d'arbre phylogénétique sous CLC

### 3.2.2.6 Recherche des SNP spécifique et recherche de marqueur Kasp®

Pour la recherche de SNP spécifique il faut faire l'alignement de plusieurs séquences et repérer un SNP qui différencie les individus sensibles des individus résistants. Dans notre projet on a utilisé le programme CLC.

- Après avoir repérer le SNP il faut dessiner une amorce avec. Il y a plusieurs outils qui permettent de faire cette étape, (primer3 ou primer Blast).
- Avec Primer blast : on définit différents paramètres.
  - Taille des produits d'amplification : le plus petit possible min : 45pb max : 100pb optimal : 45pb

- $T_m$  -> min : 53°C max : 77°C (le plus souvent les amorces sont définies entre 57-62°C).
- Taille des amorces : 25 bases min : 20 max : 32 (sans compter les extensions)
- Max Self Complementarity: Max 3' Self Complementarity: 3
- Imposer le design de l'amorce spécifique pour qu'elle porte le SNP sur sa dernière base.
- Une fois les amorces dessinées, il faut vérifier la spécificité de amorces Kasp® par Blast sur le génome de référence pécher sur GDR.
- Choisir le duo d'amorce le plus spécifique possible parmi celles dessinées par primerBlast, et éviter que le coefficient de self complémentarity soit supérieures à 5 (risque d'auto hybridation de l'amorce)

The screenshot displays the Primer Blast web interface with the following sections and values:

- Enter accession, gi, or FASTA sequence:** ACCGGCTATCTGGAAGTTGAAGCAAGAAGAACTTAAGATGTTAACCTGCCCTTCTAACTGTAGTATTGTAATGTAATAATAGG  
GAAGACGTTGCTTGCAAAAACACTAGCTCGTTTTGTGAATGTGCCAT
- Range:** Forward primer (From: , To: ), Reverse primer (From: , To: )
- Primer Parameters:**
  - Use my own forward primer (5'→3' on plus strand): GATGTTAACCTGCCCTTCTAACTG
  - Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand):
  - PCR product size: Min 45, Max 100
  - # of primers to return: 10
  - Primer melting temperatures ( $T_m$ ): Min 55, Opt 60.0, Max 65, Max  $T_m$  difference 1
- Exon/intron selection:**
  - Exon junction span: No preference
  - Exon junction match: Exon at 5' side 7, Exon at 3' side 4
  - Intron inclusion:  Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA
  - Intron length range: Min 1000, Max 1000000
- Primer Pair Specificity Checking Parameters:**
  - Specificity check:  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow.

Figure 14 : lancer Primer Blast

# 4

## Résultats et Discussion



## 4.1 Analyse des séquences

### 4.1.1 Rappel des données acquises

La séquence et l'annotation du gène Ma du clone myrobolan P2175 ont été publiées par Claverie et al (2011) et ont été enregistrées dans la base de données de NCBI. La séquence de l'allèle Ma résistant de P2175 a été séquencée à partir du BAC 76H19 et l'allèle Ma sensible de P2175 a été séquencé à partir du BAC 40K9. Le gène Ma a été identifié par clonage positionnel parmi un cluster de gènes, comme le gène responsable de la résistance aux nématode. Le séquençage de la séquence transcrite de ce gène a permis de positionner la position des exons et des introns dans le gène et de définir la structure du gène comme un étant un gène de la famille NBS LRR.

En blastant ce gène sur le génome de référence du Pêcher V2 ([https://www.rosaceae.org/species/prunus\\_persica/genome\\_v2.0.a1](https://www.rosaceae.org/species/prunus_persica/genome_v2.0.a1)), on a pu voir que le gène PRUPE G7. 6500 du pêcher était l'orthologue du gène Ma. Il a conservé la même structure que le gène Ma, avec 9 exons et 8 introns mais il a perdu sa fonction de résistance. L'allèle sensible Ma de P2175 a également la même structure que l'allèle résistant Ma.

La structure de ces allèles est représentée dans la figure 16 , avec le nombre de nucléotide présent dans chaque domaine. Dans le tableau 10, la position sur le scaffold 7 du génome de référence pêcher V2, des introns et exons de PRUPE G7.6500 est indiquée.

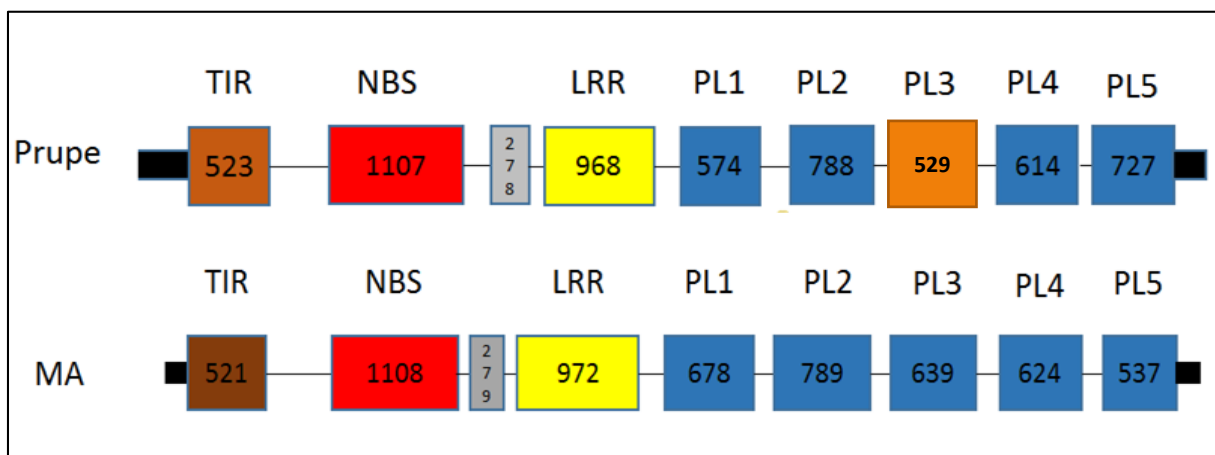


Figure 15 : structure des allèles Ma et Prupe G7. 6500

#### 4.1.2 Obtention de nouvelles séquences de gène orthologue Ma à partir des séquences NGS disponibles

Des données de séquençage ont été obtenues par séquençage NGS Illumina de variétés de prunier myrobolan, d'abricotiers, de pêcher et d'amandiers (tableau 4). Elles ont été alignées sur le génome de référence pêcher V2. L'alignement avec les variétés de pêcher sur cette référence donne de bons résultats car c'est la même espèce. Par contre l'alignement des variétés de myrobolan, abricotier et amandier sur la référence pêcher est moins bon car les espèces, bien qu'appartenant au genre *Prunus* sont différentes et seulement 60 à 70% des reads ont pu s'aligner proprement. Comme on s'intéresse à la région du gène Ma, on a créé 3 nouvelles références en substituant dans cette région la séquence pêcher par les séquences de 3 BACS celle de l'allèle résistant Ma du BAC 76H19, celle de l'allèle sensible Ma du BAC 40K9, celle de l'allèle orthologue de Ma de l'amandier Alnem correspondant au gène RMja. Ces 3 nouvelles séquences de référence (nommés aussi « **patch** ») ont été appelées pêcher V2 Ma-R, pêcher V2-Ma-S et pêcher V2-Alnem.

Dans le tableau 5, la position des allèles Ma sur ces 3 nouvelles références (=patch) est indiquée.

Les « reads » Illumina des variétés de pêcher reséquencées ont été alignés sur la séquence pêcher V2, mais les « reads » Illumina des variétés de myrobolan et d'abricotiers ont été alignés sur les deux références pêcher V2 Ma R et Ma S et les « reads » des variétés d'amandiers ont été alignés sur la séquence pêcher V2 Alnem. Pour obtenir la séquence de l'allèle Ma, les fichiers d'alignement ont été visualisés avec le logiciel IGV avec lequel il est possible d'extraire une séquence consensus de l'allèle Ma dans l'intervalle défini à partir des positions indiquées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Position du gène Ma dans les différents bacs et patch

| source          | NCBI (cDNA) |           |       | GDR (sens -) |          | Blast Ma R sur patch ? |            |          | Blast Ma R sur patch ? |            | Blast Ma R sur patch ? |            |            |            |
|-----------------|-------------|-----------|-------|--------------|----------|------------------------|------------|----------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------|------------|
|                 | gene Ma     | ma_R      |       | Prue7G065400 |          | patch 76H19            |            |          | patch 40k9             |            | patch alnem            |            |            |            |
|                 | début       | fin       | inter | Début        | Fin      | inter                  | Début      | Fin      | inter                  | Début      | Fin                    | Début      | Fin        | inter      |
| region          |             |           |       | 10251022     | 10509515 |                        |            |          |                        |            |                        | 10251022   | 10 587 147 |            |
| gene Ma         |             | 1 9477    | 9476  | 10389382     | 10381090 | 8292                   |            |          |                        |            |                        |            |            |            |
| mRNA            |             | 1         |       |              |          |                        |            |          |                        |            |                        |            |            |            |
| five_prime_UTR  |             | 1 91      | 91    | 10389382     | 10389256 | 126                    |            |          |                        |            |                        | 10 448 467 |            |            |
| exon1 (ATG)     | TIR         | 92 521    | 521   | 10389255     | 10388732 | 523                    | 10407030   | 10406510 | 520                    | 10 385 806 | 10385280               | 10 448 411 | 10 447 853 | 558        |
| intron1         |             | 613 2636  | 2115  | 10388731     | 10388089 | 642                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 447 852 | 10 447 211 | 641        |
| exon2           | NBS         | 2728      | 1108  | 10388090     | 10386983 | 1107                   | 10404396   | 10403286 | 1110                   | 10 383 236 | 10382120               | 10 447 210 | 10 446 103 | 1 107      |
| intron2         |             | 3836 4080 | 245   | 10386982     | 10386739 | 243                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 446 102 | 10 445 859 | 243        |
| exon3           | NL          | 4081 4359 | 279   | 10386738     | 10386460 | 278                    | 10403043   | 10402763 | 280                    | 10 381 884 | 10381600               | 10 445 858 | 10 445 580 | 278        |
| intron3         |             | 4360 4499 | 140   | 10386459     | 10386318 | 141                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 445 579 | 10 445 440 | 139        |
| exon4           | LRR         | 4500 5471 | 972   | 10386319     | 10385351 | 968                    | 10402622   | 10401650 | 972                    | 10 381 463 | 10380490               | 10 445 439 | 10 444 471 | 968        |
| intron4         |             | 5472 5586 | 115   | 10385350     | 10385249 | 101                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 444 470 | 10 444 368 | 102        |
| exon5           | PL1         | 5587 6264 | 678   | 10385248     | 10384571 | 677                    | 10401537   | 10400857 | 680                    | 10 380 412 | 10379730               | 10 444 367 | 10 443 793 | 574        |
| intron5         |             | 6265 6368 | 104   | 10384570     | 10384431 | 139                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 443 792 | 10 443 693 | 99         |
| exon6           | PL2         | 6369 7157 | 789   | 10384432     | 10383644 | 788                    | 10400755   | 10399964 | 791                    | 10 379 648 | 10378850               | 10 443 692 | 10 442 904 | 788        |
| intron6         |             | 7158 7255 | 98    | 10383643     | 10383522 | 121                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 442 903 | 10 442 770 | 133        |
| exon7           | PL3         | 7256 7894 | 639   | 10383523     | 10382942 | 581                    | 10 399 866 | 10399220 | 646                    | 10 378 724 | 10378090               | 10 442 769 | 10 441 840 | 929        |
| intron7         |             | 7895 7989 | 95    | 10382941     | 10382813 | 128                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 441 839 | 10 441 743 | 96         |
| exon8           | PL4         | 7990 8613 | 624   | 10382814     | 10382200 | 614                    | 10399133   | 10398508 | 625                    | 10 378 013 | 10377390               | 10 441 742 | 10 441 128 | 614        |
| intron8         |             | 8614 8741 | 128   | 10382199     | 10381938 | 261                    |            |          | 0                      |            |                        | 10 441 127 | 10 440 891 | 236        |
| stop_codon      |             |           |       |              |          |                        |            |          | 0                      |            |                        | 10 440 890 | 10 440 888 | 2          |
| exon9           | PL5         | 8742 9477 | 537   | 10381939     | 10381403 | 536                    | 10 398 381 | 10397840 | 541                    | 10 377 171 | 10376630               | 10 440 887 | 10 440 160 | 727        |
| three_prime_UTR |             | 9279 9477 | 198   |              |          |                        |            |          |                        |            |                        |            |            |            |
| three_prime_UTR |             | 9279 9442 |       |              | 10381090 |                        |            |          |                        |            |                        |            |            | 10 587 147 |

#### 4.1.2.1 Séquences myrobolan : P2175 (MA/ma) et P1079 (MA/MA)

P2175 est hétérozygote pour le gène Ma et possède un allèle sensible et un allèle résistant, Les deux séquences de ses deux allèles sont connues puisqu'elles ont été séquencées dans les BAC 76H19 et 40K9. Mais pour vérifier notre méthode, nous avons alignées les reads NGS de P2175 obtenus par séquençage illumina, sur nos deux références pêcher V2-Ma-R et Ma-S. (figure 16). La séquence consensus obtenu avec IGV correspond bien aux séquences obtenues avec les BAC. Cela confirme que le reséquençage NGS illumina effectué par la plate-forme MGX de Montpellier est de bonne qualité.

Les séquences consensus à partir des variétés abricotiers ont aussi été extraites. Sur certaine partie de la séquence Ma, on a pu voir qu'il n'y avait aucun reads alignés. L'espèce abricotier étant différente de l'espèce myrobolan, c'est logique qu'il n'y ait pas une parfaite homologie.

Dans la séquence consensus, les zones où il n'y a aucun reads alignés sont notées avec le symbole N (= inconnu)



Figure 16 :alignement des reads d'abricot sur la référence pêcher V2 76H19

La séquence d'un autre clone de Myrobolan résistant P1079 a été analysée ; on a pu identifier les séquences des deux allèles présents qui sont assez proche ; on a représenté sur le même arbre phylogénique, les deux myrobolan P2175 (Ma\_R et Ma\_S) et P1079, l'abricotier Bergeron.

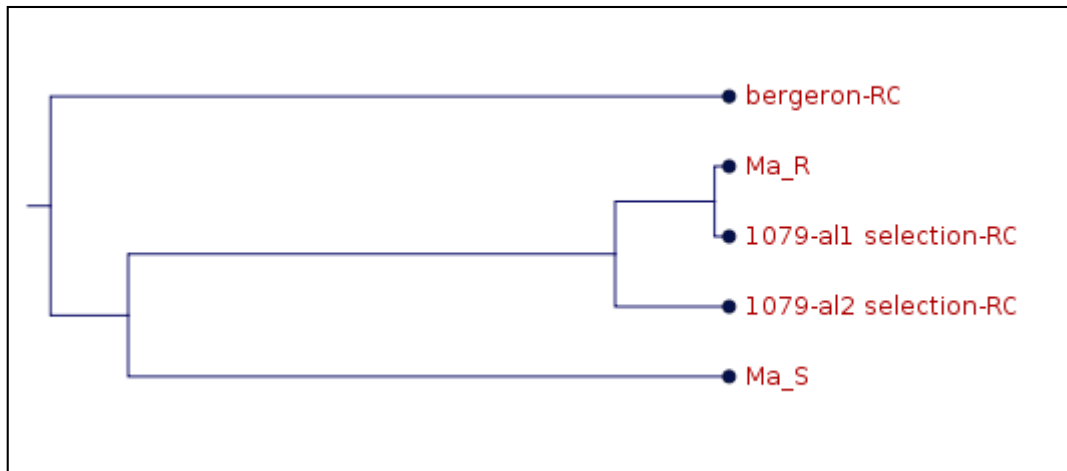


Figure 17: Arbre phylogénétique Ma pour les variétés abricot et myrobolan

Tableau 6: % identité de la séquence (partie supérieure) et différence de nombre de bases (partie inférieure)

|                       | 1 | 2     | 3     | 4     | 5     |
|-----------------------|---|-------|-------|-------|-------|
| 1079-al1 selection-RC | 1 | 99,51 | 99,93 | 93,93 | 91,52 |
| 1079-al2 selection-RC | 2 | 45    | 99,47 | 93,70 | 91,47 |
| Ma_R-trim             | 3 | 6     | 49    | 93,90 | 91,51 |
| Ma_S                  | 4 | 568   | 589   | 570   | 87,22 |
| bergeron-RC           | 5 | 780   | 784   | 781   | 1194  |

D'après les résultats obtenues l'allèle de P1079 est proche de Ma\_R. c'est logique puisque P1079 est homozygote résistant. Donc il y a une variabilité dans l'allèle R sans perdre la résistance.

Il y a un % identité de 93.90% de l'allèle Ma\_R avec l'allèle sensible Ma\_S, et l'allèle Ma\_R est plus proche que Ma\_S de l'allèle abricot avec respectivement, 91.51% et 87,22% d'identité. Pourtant L'allèle d'abricot n'apporte pas la résistance.

#### 4.1.2.2 Séquences pêcher

Huit variétés de pêcher ont été reséquencées et alignées sur la référence V2 du pêcher. Sous IGV, une séquence consensus a été extraite à partir des positions connues du gène PRUPE G7.6500 sur le scaffold 7 de la référence soit de la position 10 381 403 à 10 389 382 (tableau 5)

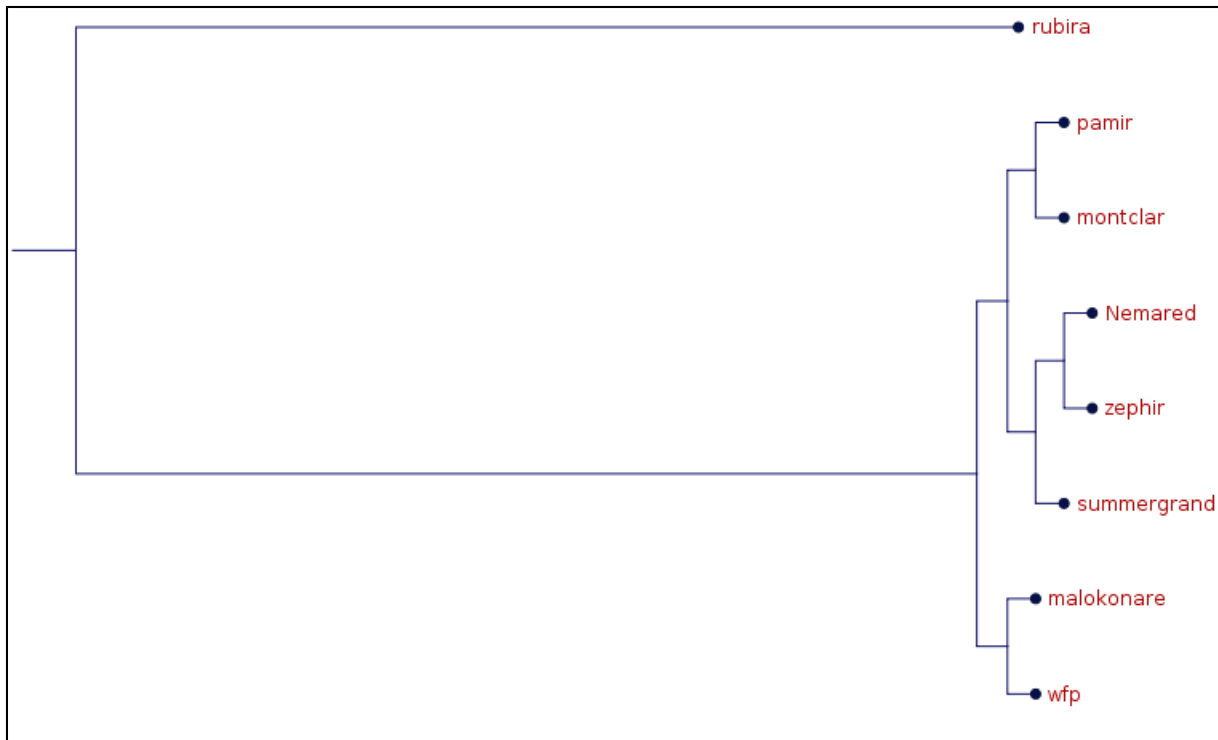


Figure 18 : Arbre phylogénique Ma pour les variétés pêcher ((UPGMA, Distance Jukes-Cantor)

Tableau 7 : % identité de la séquence et différence de nombre de bases pour les pêchers

|             |   | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7      | 8      |
|-------------|---|-----|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| montclar    | 1 |     | 99,99 | 99,99 | 99,93 | 99,89 | 97,30 | 99,99  | 99,99  |
| pamir       | 2 | 1   |       | 99,96 | 99,90 | 99,87 | 97,29 | 99,96  | 99,96  |
| zephir      | 3 | 1   | 3     |       | 99,93 | 99,90 | 97,31 | 100,00 | 100,00 |
| wfp         | 4 | 6   | 8     | 6     |       | 99,98 | 99,61 | 99,93  | 99,93  |
| malokonare  | 5 | 9   | 11    | 8     | 2     |       | 99,58 | 99,90  | 99,90  |
| rubira      | 6 | 224 | 225   | 223   | 32    | 35    |       | 97,31  | 97,32  |
| Nemared     | 7 | 1   | 3     | 0     | 6     | 8     | 223   |        | 100,00 |
| summergrand | 8 | 1   | 3     | 0     | 6     | 8     | 222   | 0      |        |

Il y a très peu de différences entre les variétés reséquencées avec la variété du génome de référence Lovell avec seulement 0 à 9 bases différentes.

Par contre Rubira est très éloignée, de la variété de référence Lovell, et un peu moins avec Wfp et malokonare. Dans la séquence consensus de Rubira, il y a eu beaucoup de zones avec des nucléotides inconnus («N») car il y a eu beaucoup de reads non alignées sur la séquence de référence V2. On ne connaît pas l'origine exacte de Rubira, mais il y a certainement eu une introgression de gènes venant d'autres espèces Prunus autres que le pêcher.

### 4.1.2.3 Séquences amandier

On disposait de 11 variétés d'amandier reséquencées (Illumina) (Tableau 4), les 2 variétés Lauranne et Alnem ayant été reséquencées à la plate-forme MGX de Montpellier et 9 autres variétés reséquencées par la plateforme CNAG-CRG de Barcelone. Les recherches de caractérisation du gène de résistance aux nématodes d'Alnem RMja, menées au GAFL ont montré que RMja était un orthologue de Ma. Une banque BAC a été construite au CNRGV de Toulouse et deux BAC (43O01 et 17 E21) contenant le gène RMja ont été screenés et séquencés. Les deux séquences des deux BAC ont été alignées sur leur partie commune et une séquence BAC unique de 300kb a été obtenue (43O01-17E21).

Comme pour l'étude sur le myrobolan, grâce à l'existence de cette séquence BAC d'Alnem, une nouvelle référence appelée pêcher V2 Alnem a été construite en substituant de la référence pêcher V2, la zone blastant avec le BAC (43O01-17E21), par la séquence de ce BAC. Les positions du gène RMja orthologue de Ma dans cette nouvelle référence pêcher V2 Alnem, sont indiquées dans le tableau 5, soit de la position 10 440 160 à 10 448 411 sur le scaffold 7

Quand on fait l'alignement de la séquence NGS d'Alnem sur la nouvelle référence pêcher V2 Alnem, on observe un alignement de reads sur toute la zone incluant le BAC RMja, ce qui montre que le reséquencage NGX d'Alnem était de bonne qualité.

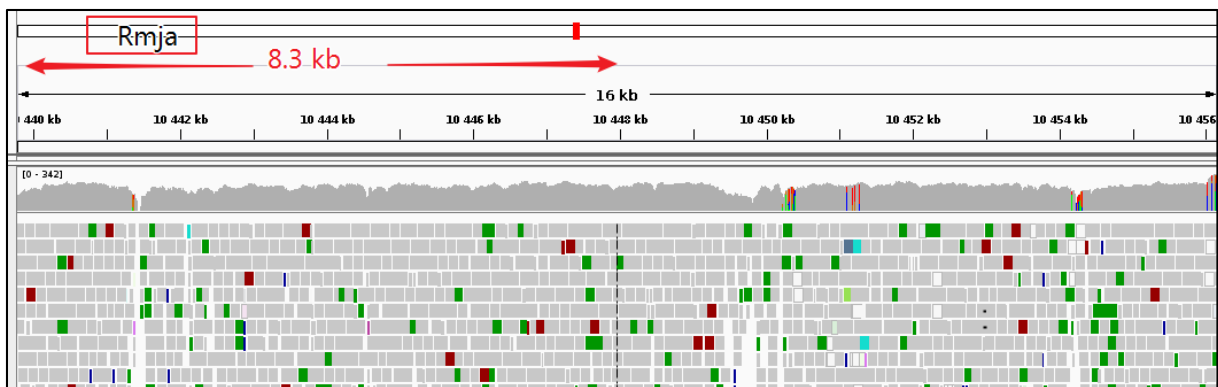


Figure 19 : alignement des reads Illumina d'Alnem sur la référence pêcher V2 alnem

On peut remarquer que l'alignement qui avait été fait sur la référence pêcher V2 avec ces mêmes reads d'Alnem, montrait beaucoup de zones sans reads alignés, notamment dans la partie correspondant au promoteur du gène. Et parmi les reads alignés dans le gène, on peut voir que la qualité d'alignement est peu élevée.

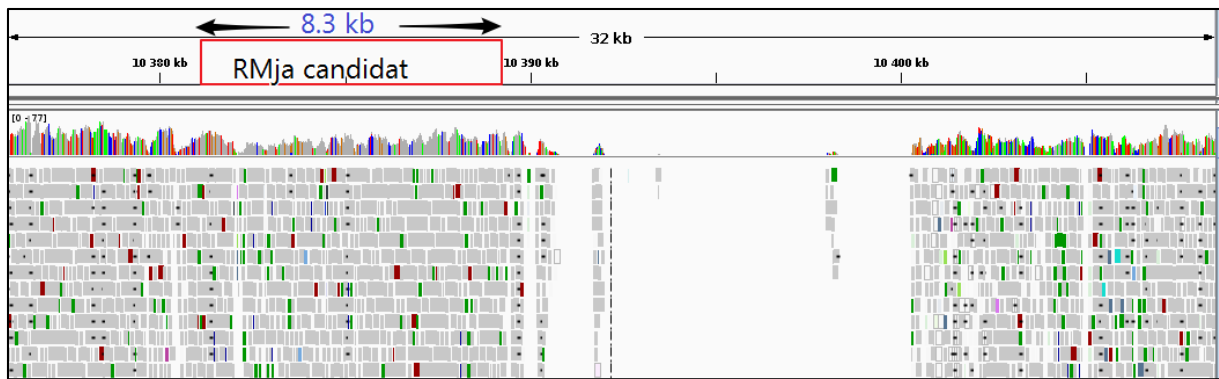


Figure 20 : aligment des reads alnem sur la référence pêcher V2

Après l'aligment des autres variétés d'amandier sur la référence Pêcher V2 Alnem, la séquence consensus dans l'intervalle RMja a été extraite pour chaque variété. Ces séquences ont été alignées entre elles et comparées. (Figure 21 et tableau 8).

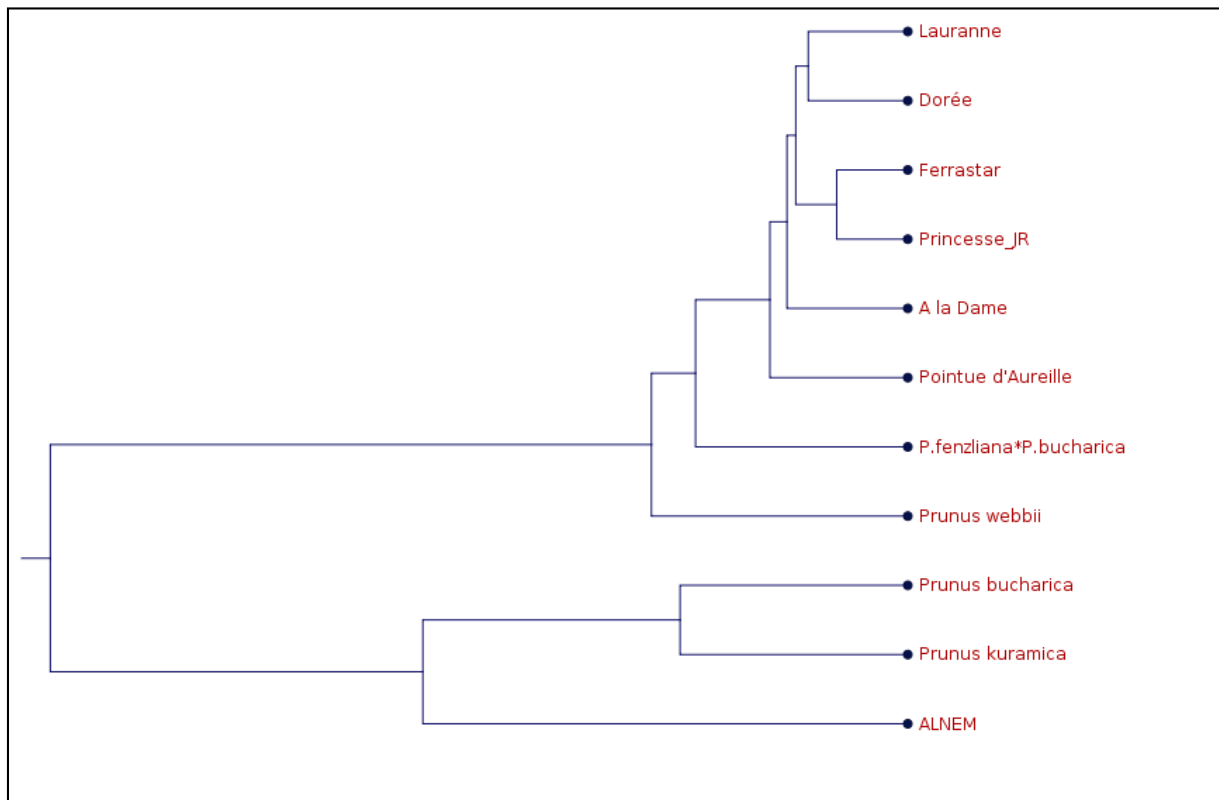


Figure 21 : arbre phylogénique d'amandier (UPGMA, Distance Jukes-Cantor)



Tableau 8 : % identité de la séquence et différence de nombre de bases entre amandier

|                        | 1  | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |
|------------------------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Lauranne               | 1  | 99,83 | 99,84 | 99,81 | 99,79 | 99,81 | 99,81 | 99,65 | 99,13 | 98,44 | 97,26 |
| Dorée                  | 2  | 14    | 99,78 | 99,81 | 99,79 | 99,77 | 99,55 | 99,53 | 99,01 | 98,30 | 96,96 |
| Ferrastar              | 3  | 13    | 18    | 99,88 | 99,81 | 99,75 | 99,60 | 99,60 | 99,04 | 98,32 | 97,03 |
| Princesse-JR           | 4  | 16    | 16    | 10    | 99,78 | 99,75 | 99,58 | 99,65 | 99,02 | 98,27 | 96,93 |
| A la Dame              | 5  | 17    | 17    | 16    | 18    | 99,76 | 99,62 | 99,54 | 98,91 | 98,17 | 96,82 |
| Pointue d'Aureille     | 6  | 16    | 19    | 21    | 21    | 20    | 99,67 | 99,54 | 98,98 | 98,24 | 96,93 |
| P.fenziana*P.bucharica | 7  | 16    | 37    | 33    | 35    | 31    | 27    | 99,44 | 98,91 | 98,17 | 96,87 |
| Prunus webbii          | 8  | 29    | 39    | 33    | 29    | 38    | 38    | 46    | 99,30 | 98,98 | 97,62 |
| Prunus bucharica       | 9  | 72    | 82    | 79    | 81    | 90    | 84    | 90    | 58    | 99,61 | 97,87 |
| Prunus Kuramica        | 10 | 129   | 140   | 139   | 143   | 151   | 145   | 151   | 84    | 32    | 98,05 |
| ALNEM                  | 11 | 228   | 253   | 247   | 255   | 264   | 255   | 260   | 198   | 177   | 162   |

La séquence RMja d'Alnem est assez différente des autres séquences amandier, avec 96 à 97% d'identité avec les autres variétés d'amandier, 97,62 % avec le clone de *Prunus webbii*, 97,87% avec le clone de *Prunus bucharica* et 98,05 % avec le clone de *Prunus kuramica*. Ces dernières espèces sont des espèces sauvages d'amandier et le fait qu'Alnem soit plus éloignée des variétés d'amandier cultivé (*Prunus dulcis*) que des espèces sauvages laisse à penser que RMja ait été introgressé d'une autres espèce *Prunus* sauvage. Par ailleurs, parmi les variétés de ce groupe, seul Alnem présente une résistance aux nématodes.

#### 4.1.2.4 Alignement multiples sur toutes les espèces *Prunus*

Nous avons fait un alignement multiple sur l'ensemble des espèces *Prunus* pour voir comment se situent les variétés résistantes par rapport aux variétés sensibles.

Dans l'arbre phylogénique, la position des différentes variétés correspond à celle trouvée dans la classification des *Prunus* de Redher, exceptée pour deux variétés Alnem et Rubira. Alnem se situe entre le pêcher et le Myrobolan, alors que Rubira se situe parmi les variétés myrobolan

Ce serait intéressant de retrouver des espèces *Prunus* qui ait une séquence très proche de celles de de ces deux accessions et on pourrait faire des hypothèses sur l'étude de leur pedigree et l'origine des introgressions qui sont présentes dans leur génome.

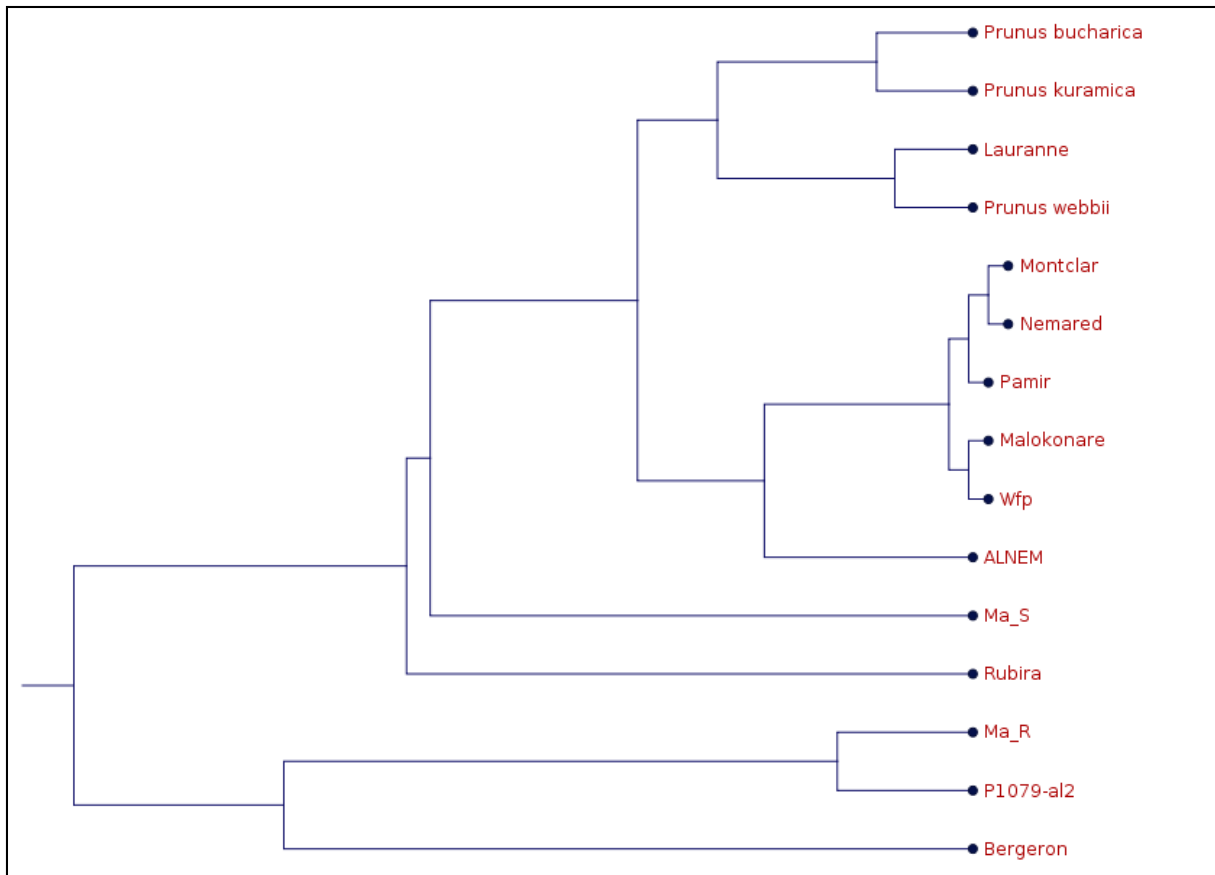


Figure 22 : Arbre phylogénique avec différentes variétés et espèces Prunus((UPGMA, Distance Jukes-Cantor)

Tableau 9 : %d'identité et différence entre Prunus

|                  |    | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    |
|------------------|----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Prunus Bucharica | 1  |      | 99,30 | 98,83 | 99,10 | 97,36 | 97,17 | 97,09 | 97,59 | 97,52 | 97,88 | 76,71 | 96,35 | 78,22 | 75,38 | 69,74 |
| Prunus Kuramica  | 2  | 0,00 |       | 98,44 | 98,79 | 97,52 | 97,34 | 97,25 | 97,64 | 97,61 | 98,19 | 76,57 | 95,67 | 77,89 | 75,02 | 69,55 |
| Lauranne         | 3  | 0,01 | 0,02  |       | 99,47 | 96,50 | 96,29 | 96,21 | 97,17 | 97,18 | 97,30 | 76,13 | 95,98 | 77,79 | 74,95 | 69,39 |
| Prunus Webbii    | 4  | 0,01 | 0,01  | 0,00  |       | 97,00 | 96,82 | 96,74 | 97,47 | 97,45 | 97,73 | 76,63 | 96,13 | 78,14 | 75,28 | 69,70 |
| Montclar         | 5  | 0,01 | 0,01  | 0,02  | 0,02  |       | 99,99 | 99,99 | 99,89 | 99,93 | 98,18 | 76,27 | 97,30 | 77,51 | 74,57 | 69,29 |
| Nemared          | 6  | 0,01 | 0,01  | 0,02  | 0,02  | 0,00  |       | 99,96 | 99,90 | 99,93 | 98,20 | 76,26 | 97,31 | 77,51 | 74,57 | 69,25 |
| Pamir            | 7  | 0,01 | 0,01  | 0,02  | 0,02  | 0,00  | 0,00  |       | 99,87 | 99,90 | 98,16 | 76,22 | 97,29 | 77,50 | 74,57 | 69,23 |
| Malokonare       | 8  | 0,01 | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |       | 99,98 | 98,51 | 76,75 | 99,58 | 78,46 | 75,43 | 69,96 |
| wfp              | 9  | 0,01 | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,00  | 0,00  | 0,00  | 0,00  |       | 98,47 | 76,66 | 99,61 | 78,38 | 75,35 | 69,91 |
| ALNEM            | 10 | 0,01 | 0,01  | 0,02  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  |       | 76,27 | 96,38 | 77,64 | 74,59 | 69,32 |
| Ma_S             | 11 | 0,02 | 0,02  | 0,03  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02  |       | 75,52 | 90,96 | 93,70 | 87,22 |
| rubira-RC        | 12 | 0,02 | 0,03  | 0,03  | 0,02  | 0,03  | 0,03  | 0,03  | 0,00  | 0,00  | 0,03  | 0,03  |       | 77,56 | 74,55 | 69,17 |
| Ma_R             | 13 | 0,03 | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,03  | 0,04  | 0,03  | 0,04  |       | 95,86 | 87,51 |
| 1079-al2         | 14 | 0,03 | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,03  | 0,04  | 0,03  | 0,04  | 0,01  |       | 90,02 |
| bergeron         | 15 | 0,04 | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,03  | 0,04  | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,03  |       |

### 4.1.3 Recherche et mise au point de marqueurs Kasp® pour le gène RMja

#### 4.1.3.1 Recherche du SNP

A partir des alignements obtenus sur plusieurs variétés, nous avons recherché un SNP qui pourrait servir de marqueurs moléculaires pour différencier les variétés sensibles d’amandier et de pêcher de la variété résistante d’Alnem. Un SNP localisé discriminant à la fois les variétés porteuses de l’allèle Résistant de Ma et RMja d’Alnem des autres variétés sensibles a été localisé dans le domaine PL2 du gène Ma et RMja. Pour transformer cet SNP en marqueurs KASP®, il fallait également que cet SNP ne soit pas, entouré d’autres SNP, ce qui était le cas. (Figure 23).

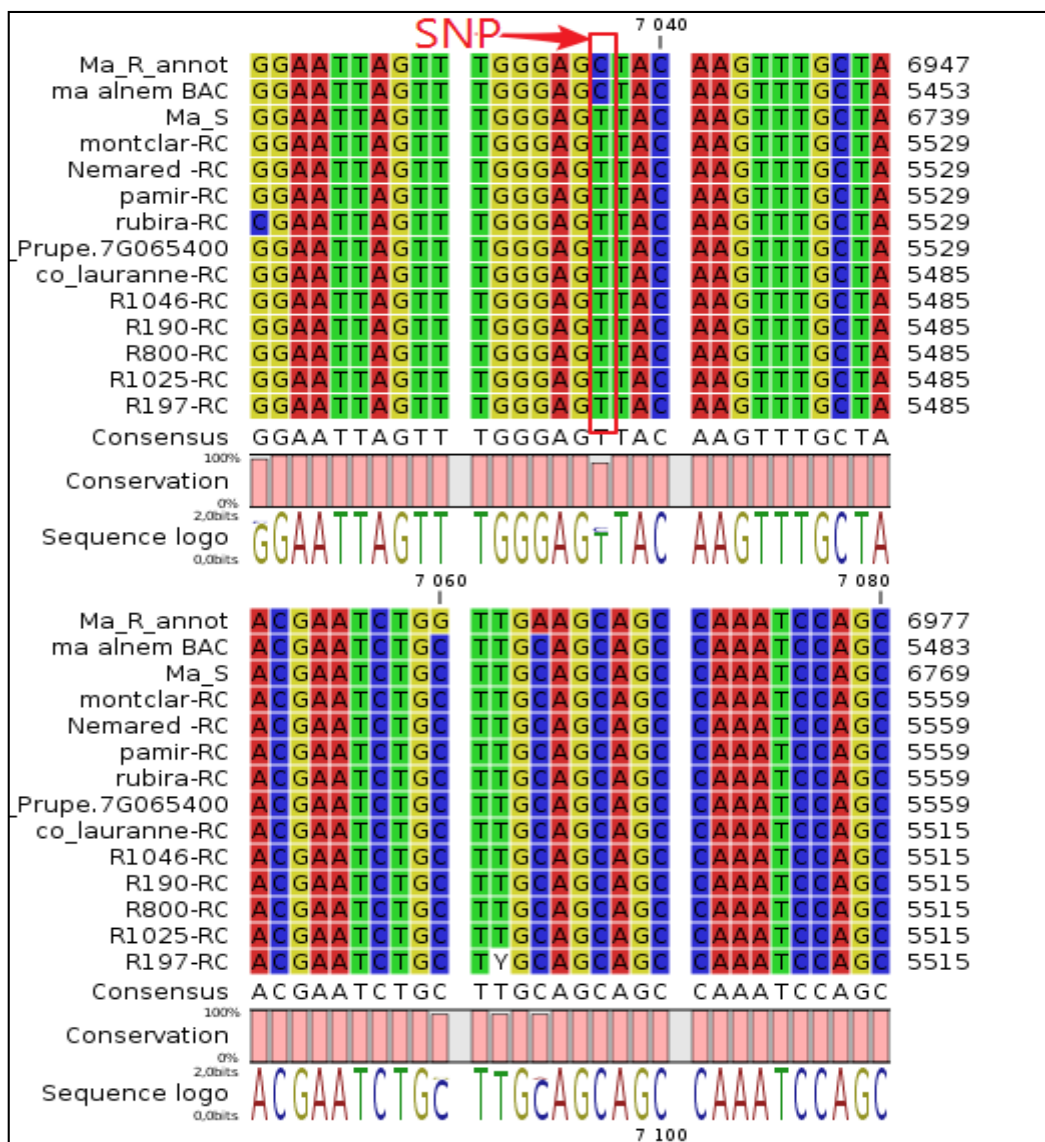


Figure 23 : Alignement des différentes séquences et détection d’un SNP

#### 4.1.3.2 Recherches d'amorces

A partir du SNP détecté, 4 couples d'amorces ont été dessinés et ensuite testés avec un échantillon de variétés et d'hybrides dont on connaissait le génotype. Résultats à montrer que Deux couples d'amorces ont donné des résultats prometteurs SP903 et SP904 La figure qui suit résume le résultat obtenu.

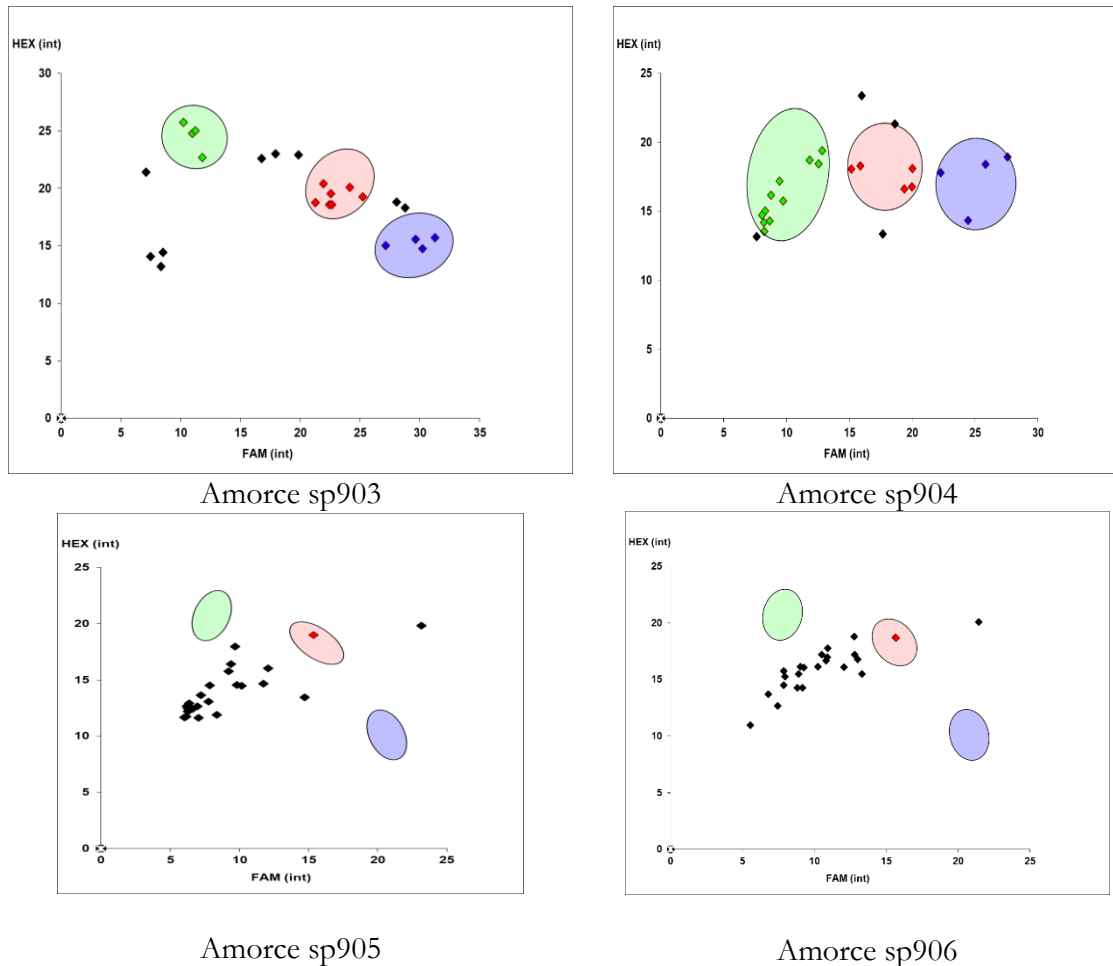


Figure 24 résultats du test kasp® des marqueurs sp903, 904, 905, 906 sur des hybrides F2 Lauranne x Alnem

D'après ces résultats nous remarquons que les marqueurs le plus spécifique dans ces 4 marqueurs que nous avons dessinés c'est le sp903 et le sp904 puisque nous pouvons différencier entre les nuages. Par contre, il y a des points négatifs et une optimisation du cycle PCR doit être effectuée.

### 4.1.3.3 Génotypage de nouveaux hybrides à partir du nouveau marqueur Kasp

Nous avons utilisé les deux marqueurs sp903 et sp904 sur plus d'hybrides Lauranne x Alnem

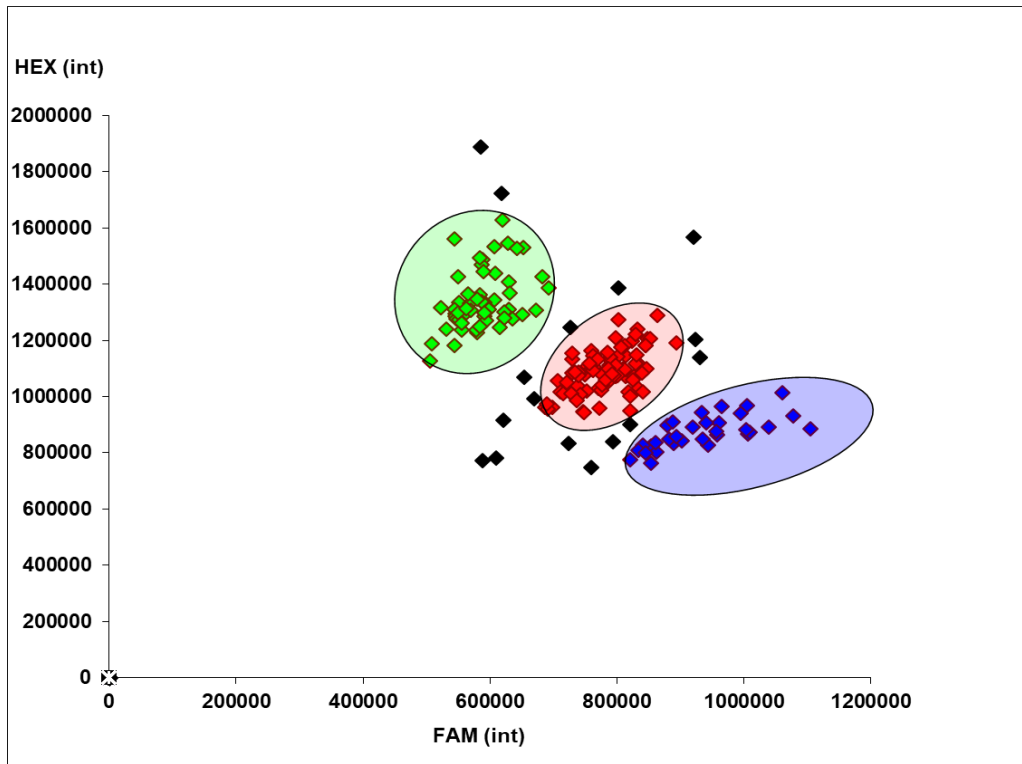


Figure 25 : Résultats du test KASP pour le marqueur SP903 sur 150 hybrides Lauranne x Alnem

Vert = homozygotes SS ; rouge = hétérozygotes RS ; Bleu = homozygotes RR Noir = Négatives

Le phénotypage de ces hybrides est en cours à l'INRA d'Antibes on a pu faire une première lecture sur 20 hybrides, (et nous avons comparé les résultats du phénotype s avec les génotypes obtenus par Kasp® (Tableau 10).

Tableau 10: Génotypage par technique kasp® et phénotypage d'hybrides amandier F2 Lauranne x Alnem

| -         | sp904_TM60 | sp904_TM60<br>avec<br>recycling | sp903_TM60 | sp903_TM60<br>avec<br>recycling | génotype | phénotype |
|-----------|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|----------|-----------|
| LA115_015 | FAMFAM     | FAMFAM                          | FAMFAM     | FAMFAM                          | RR       | R         |
| LA115_016 | FAMFAM     | FAMFAM                          | FAMFAM     | FAMFAM                          | RR       | R         |
| LA115_021 | FAMHEX     | FAMHEX                          | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_028 | -          | FAMHEX                          | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_044 | FAMHEX     | FAMHEX                          | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_046 | FAMHEX     | FAMHEX                          | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_047 | FAMHEX     | FAMHEX                          | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_052 | HEXHEX     | HEXHEX                          | HEXHEX     | HEXHEX                          | SS       | S         |
| LA115_053 | FAMHEX     | -                               | FAMFAM     | FAMFAM                          | RR       | R         |
| LA115_055 | -          | -                               | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_073 | FAMHEX     | FAMHEX                          | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |

| -         | sp904_TM60 | sp904_TM60<br>avec<br>recycling | sp903_TM60 | sp903_TM60<br>avec<br>recycling | génotype | phénotype |
|-----------|------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|----------|-----------|
| LA115_074 | -          | HEXHEX                          | -          | -                               | SS       | S         |
| LA115_079 | HEXHEX     | HEXHEX                          | HEXHEX     | HEXHEX                          | SS       | S         |
| LA115_143 | FAMHEX     | FAMHEX                          | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_146 | -          | -                               | FAMHEX     | FAMHEX                          | RS       | R         |
| LA115_147 | -          | -                               | FAMFAM     | FAMFAM                          | RR       | R         |
| LA115_148 | HEXHEX     | HEXHEX                          | HEXHEX     | HEXHEX                          | SS       | S         |
| LA115_149 | FAMFAM     | -                               | FAMFAM     | FAMFAM                          | RR       | R         |
| LA115_151 | HEXHEX     | HEXHEX                          | HEXHEX     | HEXHEX                          | SS       | S         |

Il y a une bonne cohérence, entre les résultats de génotypage et les résultats de phénotypage ; ces 2 marqueurs sont utilisables pour la Sélection assistée par marqueurs (SAM) pour cribler les hybrides porte-greffe porteurs de l'allèle résistant du gène RMja d'Alnem pour la résistance aux nématodes.

#### Avantages de la sélection assistée par marqueur

Cette technologie permet un gain de temps considérable dans la sélection des individus d'une population importante. Le temps nécessaire pour génotyper une plaque de 384 individus est de, deux heures trente de manipulation, auquel il faut rajouter le prélevement de feuilles et l'extraction d'ADN. Le test phénotypique pour voir si les hybrides sont résistants durent au moins de 4 mois entre la prépartaion des plants, l'inoculation et l'observation des galls sur racines. Par ailleurs dans le phénotypage, dans un individu résistant on ne sait pas si l'individu est homozygote ou hétérozygote, car le gène RMja est un gène dominant. S'il y avait un autre gène de résistance aux nématodes autre que RMj, le phénotypage ne permet pas de savoir si l'hybride possède un ou deux gènes de résistance. Enfin, les nématodes à galls sont des organismes parasites très difficiles à détruire et la réalisation des tests de phénotypage avec des inoculations nécessite des installations très contrôlées.

En résumé, la sélection assistée par marqueur est une alternative du clonage, possède les avantages suivant sur la sélection classique :

- Rapidité d'obtention des résultats
- Possibilité de tester simplement un grand nombre de plantes
- Distinction entre les individus hétérozygotes et homozygotes
- Coûts moindres que le phénotypage

## 4.2 Séquençage Sanger de deux régions de Ma (PL4 et LRR)

Pour des génotypes dont nous n'avons pas de séquences NGS Illumina, nous avons projeté de faire une analyse partielle de la séquence du gène Ma au niveau de deux régions situées dans les motifs PL4 et LRR, où l'on a observé un nombre assez important de mutations.

### 4.2.1 Construction des amorces

En premier lieu nous avons dessiné 2 couples d'amorces spécifiques pour amplifier ces 2 régions par PCR. (Figure 26)

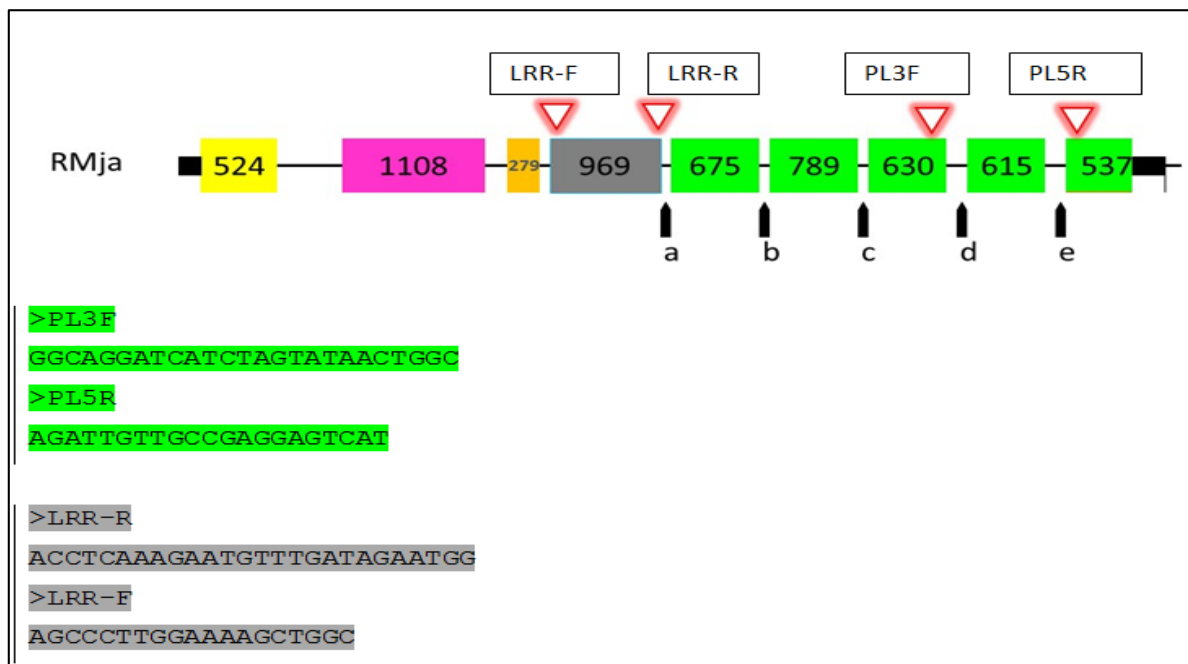


Figure 26 : les deux couples d'amorces de LRR et PL4 et leur position sur le gène RMja

### 4.2.2 PCR et électrophorèse sur gel pour séquençage

Sur les variétés choisies pour ce séquençage (tableau 3), l'ADN a été extrait à partir de jeunes feuilles. Les produits PCR obtenus avec les deux couples d'amorces (LRR\_F-LRR\_R) et (PL3\_F-PL5\_R) ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Le résultat au niveau du gel a montré qu'il y a deux bandes pour certains échantillon (figure 27) ce qui correspond à deux allèles différents du gène. Une extraction séparée de chaque bande du gel suivi d'une nouvelle PCR a permis d'avoir les deux allèles séparés et de les envoyer à séquencer séparément.

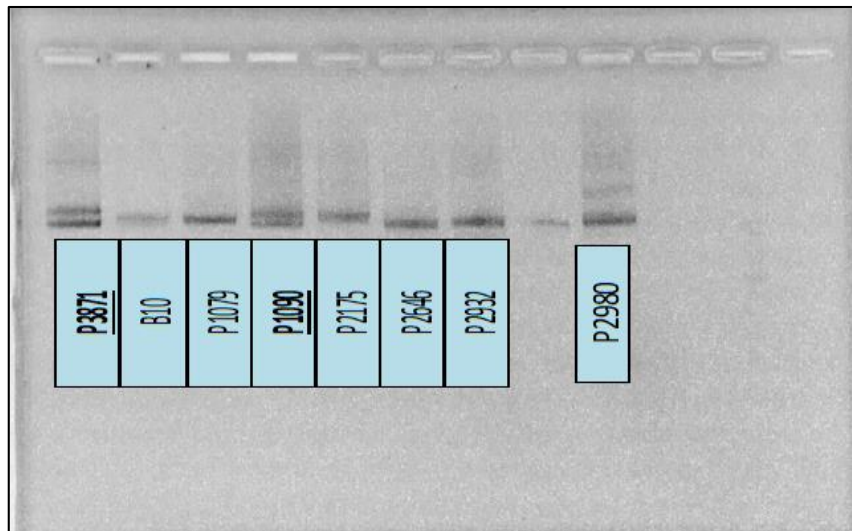


Figure 27 : séparation d'ADN sur gel d'agarose

### 4.2.3 Lecture du séquençage

Pour les 2 régions PL4 et LRR, les résultats de séquençage n'ont pas été exploitables, à cause de la présence d'un microsatellite au début de la séquence. (Figure 28). Cela a induit un décalage du cadre de lecture entre les fragments PCR qui ne permettent pas d'obtenir une séquence fiable. Le choix de l'amorce n'était pas judicieux, il aurait fallu la choisir après le microsatellite

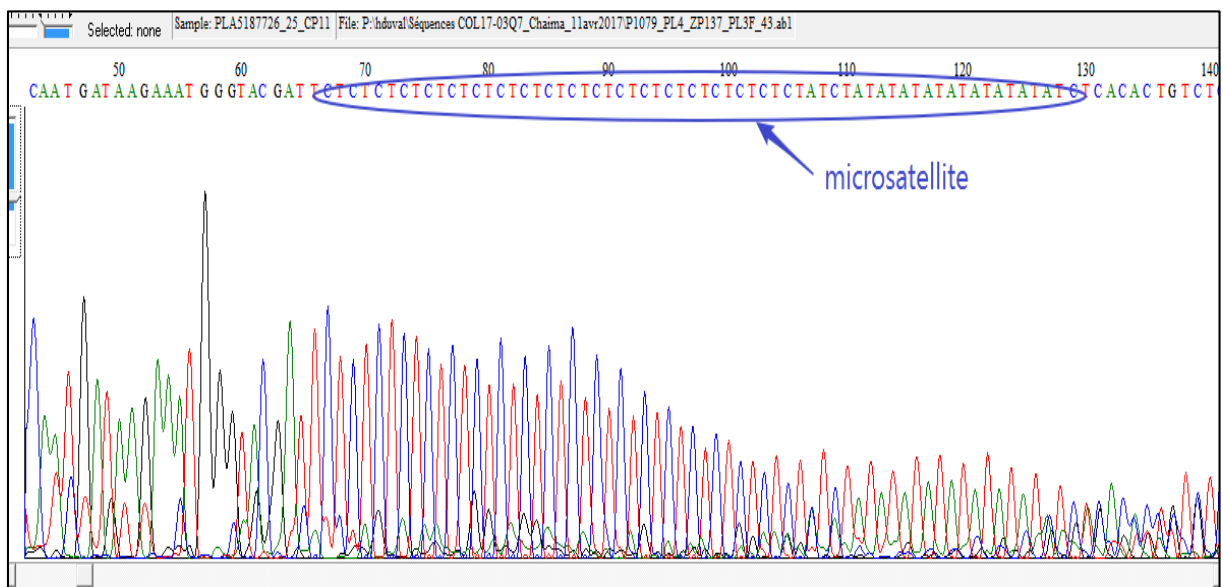


Figure 28: résultat du séquençage du domaine PL4 pour P1079



# 5

## Conclusion et Perspectives

## 5 Conclusion et perspectives

---

Du fait des restrictions d'emploi ou de l'interdiction récente des nématicides chimiques, le problème des nématodes à galles se révèle de plus en plus préoccupant. Il est donc nécessaire d'associer chercheurs et professionnels au suivi de ce problème phytosanitaire et à la recherche et l'expérimentation de nouvelles méthodes de lutte économiquement viables et durables.

C'est pour cela durant notre travail élaboré au sein de l'INRA nous avons étudié les gènes de résistances au nématode chez les Prunus par le biais de la biologie moléculaires et la bio-informatique afin de développer des outils moléculaires pour créer des variétés plus résistantes.

Pendant ce temps imparti, on a pu exploiter des données de séquences existantes de plusieurs variétés de myrobolan, pêcher, abricotier et amandier et dont on a fait l'alignement sur la région ciblée s du gène Ma. En effet, nous avons utilisé une stratégie d'analyse originale en utilisant deux types de données disponibles, la séquence de référence du pêcher accessible à la communauté scientifique sur GDR (Genome Database Rosaceae) créant et les séquences BAC provenant de banques BAC générées à l'INRA d'Avignon et INRA Sophia. Les résultats au niveau de l'arbre phylogénique pour cette région du gène Ma ont montré très peu de différence par rapport à l'arbre phylogénique des espèces Prunus de la classification de Redher. Il apparaît toutefois que le gène RMja de l'amandier Alnem est assez éloigné des autres variétés d'amandier et qu'il provient certainement d'une autre espèce Prunus appartenant peut-être au sous-genre Prunophora.

La mise au point d'un marqueur kasp® (SP903 et SP904) à partir d'un SNP issus des alignements de séquence est un résultat très précieux. Il a pu être validé sur une vingtaine d'hybrides qui ont été génotypés et phénotypés. Il reste à confirmer sur un nombre plus important d'hybrides et à optimiser les conditions de PCR pour une lecture facilement utilisable. Avec les marqueurs SCAR (CT3-4N et NSCAFLP2) qui sont disponibles pour génotyper le gène Ma, dans les variétés de Myrobolan, il sera possible de génotyper les hybrides porte-greffe Myrobolan x amandier, en utilisant à la fois les marqueurs SCAR (CT3-4N et NSCAFLP2) et les marqueurs Kasp[r]SP903 et SP904.

En perspective, Il sera intéressant d'analyser le polymorphisme les séquences en Acides aminés des différentes variétés étudiées. Il sera aussi intéressant d'observer si on retrouve des zones communes aux variétés résistantes ou aux variétés sensibles pour voir quels domaines sont impliqués dans la résistance au nématodes

On s'est concentré sur l'étude de la séquence du gène Ma, mais il faudra aussi s'intéresser à la région du promoteur. Peut-être qu'il existe des gènes de régulation dans cette zone qui activent la résistance aux nématodes.

## 6 Références bibliographiques

---

- [1] G. Salesses, “Differential Response to Root-Knot Nematodes in Prunus Species and Correlative Genetic Implications 1,” vol. 29, no. 3, pp. 370–380, 1997.
- [2] W. . M. Wouts, *Criconematina (Nematoda : Tylenchida)*. *Fauna of New Zealand* 55 , 232 pp . 2006.
- [3] P. A. and S. M. Jean-Pierre HUGOT 13, “Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study : an overview,” vol. 3, no. 3, pp. 199–208, 2001.
- [4] P. A. Abbott and T. Candresse, “Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier Docteur en Sciences de l’ ENSAM par Michel CLAVERIE Stratégie de clonage positionnel du gène Ma conférant la résistance aux nématodes du genre Meloidogyne chez le prunier myrobolan,” 2004.
- [5] A. A. Dababat and M. Imren, “The importance and management strategies of cereal cyst nematodes , Heterodera spp ., in Turkey,” pp. 173–188, 2015.
- [6] J.-C. PROT, “PHYTOPARASITES LES NEMATODES PARASITES,” *United States Agency Int. Dev. Reg. Food Crop Prot.*, p. 28, 1991.
- [7] C. Djian-caporalino, “Gestion des nématodes à galles : Lutte conventionnelle et luttes alternatives , L â€™ atout des plantes pièges,” no. January 2009, 2014.
- [8] S. R. Koenning, T. L. Kirkpatrick, J. L. Starr, J. A. Wrather, N. R. Walker, and J. D. Mueller, “Plant-Parasitic Nematodes Attacking Cotton in the United States Old and Emerging,” vol. 88, no. 2, 2004.
- [9] D. T. and V. C. Blok, “Apomictic, polyphageous root-knot nematodes : exceptionally successful and damaging biotrophic pathogens.” *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, pp. 53–77, 2001.
- [10] D. Esmenjaud *et al.*, “Tansley review Resistance to root-knot nematodes Meloidogyne spp . in woody plants,” pp. 41–56, 2016.
- [11] J. Cayrol, C. Djian-caporalino, and E. Panchaud-mattei, “la lutte biologique contre les Nématodes phytoparasites,” pp. 31–44.
- [12] M. Aran, R. Fatahi, and Z. Zamani, “MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL DISCRIMINATION OF SELECTED PLUM SEEDLINGS,” vol. 20, no. 1, pp. 5–19,

- 2012.
- [13] W. V. Baird, A. S. Estager, and J. K. Wells, “Estimating Nuclear DNA Content in Peach and Related Diploid Species Using Laser Flow Cytometry and DNA Hybridization,” vol. 119, no. 6, pp. 1312–1316, 1994.
- [14] Z. Shao *et al.*, “Long-Term Evolution of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes : Understanding Gained from and beyond the Legume Family 1 [ C ][ W ],” vol. 166, no. September, pp. 217–234, 2014.
- [15] B. C. Meyers, A. Kozik, A. Griego, H. Kuang, and R. W. Michelmore, “Genome-Wide Analysis of NBS-LRR – Encoding Genes in Arabidopsis,” vol. 15, no. April, pp. 809–834, 2003.
- [16] Y. Belkhadir, R. Subramaniam, and J. L. Dangl, “Plant disease resistance protein signaling : NBS – LRR proteins and their partners.”
- [17] D. Frost *et al.*, “Tobacco Transgenic for the Flax Rust Resistance Gene L Expresses Allele-Specific Activation of Defense Responses,” vol. 17, no. 2, pp. 224–232, 2004.
- [18] H. Zhu, S. B. Cannon, N. D. Young, and D. R. Cook, “Phylogeny and Genomic Organization of the TIR and Non-TIR NBS-LRR Resistance Gene Family in *Medicago truncatula*,” vol. 15, no. 6, pp. 529–539, 2002.
- [19] M. R. Voisin, “Spectrum of the Ma genes for resistance to *Meloidogyne* spp . in *Myrobalan plum*,” pp. 1325–1334, 1997.
- [20] E. D. . Duval H.1, Van Ghelder C.2, Masse M.1, Roch G.3, Hussié H.1, 3, “Stratégie de résistance durable aux nématodes à galles chez les porte-greffe de,” vol. 50, pp. 59–68, 2016.

#### Site web

<https://www.rosaceae.org/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://institut.inra.fr/Mission>

## Annexes

## Annexe 1 : extraction d'ADN

3

| MODE OPERATOIRE   |   |
|---|---|
| EXTRACTION ADN en plaque 96 inspiré du Dneasy kit de Qiagen | 2 |
| UR GAFL BioMol  |   |

**Objectif :** Extraction ADN en plaque 96 pour un ADN de bonne qualité (pour cartographie génétique)

### 1. REFERENCES ET VERSIONS


-D'après le protocole « extraction d'ADN en plaque 96 puits » de Christelle Troadec UMR INRA 1165 CNRS 8114 UEVE; protocole inspiré du Dneasy kit de Qiagen  
-Version réécrite et modifiée par Carole Confolent et Elodie Lecerf

### 2. PREPARATION DES SOLUTIONS

#### Préparation des tampons

#### AP1: Tampon de lyse ; 40ml nécessaires par plaques

rôle: dénaturation des protéines et Lyse des parois cellulaires

| Tampon AP1                  |                                 |                       |   |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------|--|
| Solutions:                  | n° CAS produit                  | Quantité (pour 500ml) |  |
| Tris HCl 1 M pH 8           | Tris 1185-53-1<br>HCl 7647-01-0 | 50 ml                 | H312 : Nocif par contact cutané<br>H315 Irritant pour la peau<br>H319 Irritant pour les yeux<br>H335 Irritant pour les voies respiratoires |
| EDTA 0,5M pH 8              | 600-00-4                        | 50 ml                 |  |
| NaCl 2,5 M                  | 7647-14-5                       | 100 ml                |  |
| SDS 20%                     | 151-21-3                        | 31,5 ml               |  |
| PVP 40 000                  | 9003-39-8                       | 5 g                   |  |
| H2O                         |                                 | 268 ml (qsp)          |  |
| à ajouter au dernier moment |                                 |                       |  |
| Sodium bisulfite            | 7681-57-4                       | 5 g                   |  |



Attention le sodium bisulfite est à ajouter juste avant utilisation

Ajouter 1ml de RNaseA (100mg/ml) pour 400ml de tampon AP1, et stocker à 4°C

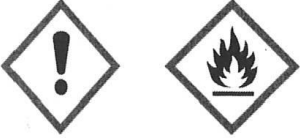
Si le tampon AP1 est visqueux et précipité, le réchauffer à 65°C quelques minutes jusqu'à liquéfaction.

#### AP2; 13ml nécessaire par plaque


rôle: Précipitation des protéines et des polysaccharides par acidification du milieu

| Tampon AP2             |                |                       |   |
|------------------------|----------------|-----------------------|--|
| Solutions:             | n° CAS produit | Quantité (pour 200ml) |  |
| KAc 5M                 | 127-08-2       | 120 ml                | H226 Hautement Inflammable<br>H314 Risque de brûlure pour la peau et les yeux  |
| Acide acétique Glacial | 64-19-7        | 23 ml                 |  |
| H2O                    |                | 57 ml (qsp)           |  |

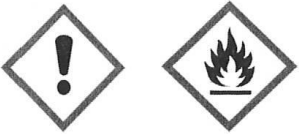
**AP3/E : 60ml nécessaires par plaque**  
rôle: Constitution des sels d'ADN

| Tampon AP3/E   |                       |                              |
|--|-----------------------|------------------------------|
| <i>Solutions:</i>  |                       |                              |
|  | <i>n° CAS produit</i> | <i>Quantité (pour 900ml)</i> |
| Guanidinium Chloride   | 50-01-1               | 223,5 g                      |
| Ethanol 96%  | 64-17-5               | 600 ml                       |
| H2O  |                       | 300 ml (qsp)                 |
|   |                       |                              |
| H302 : Nocif en cas d'ingestion<br>H315 Irritant pour la peau<br>H319 Irritant pour les yeux<br>H226 Hautement Inflammable |                       |                              |


**AW : 75ml nécessaires par plaque**  
rôle: dessaler et laver l'ADN

| Tampon AW Stock   |                       |                           |
|---|-----------------------|---------------------------|
| <i>Solutions:</i>   |                       |                           |
|   | <i>n° CAS produit</i> | <i>Quantité (pour 1L)</i> |
| Tris 1M pH 8  | Tris 1185-53-1        | 22,5 ml                   |
| EDTA 0,5M   | HCl 7647-01-0         | 200µl                     |
| KAc 5M  | 600-00-4              | 32 ml                     |
| H2O   | 127-08-2              | 945,3 ml (qsp)            |
|                      |                       |                           |
| H315 Irritant pour la peau<br>H319 Irritant pour les yeux<br>H335 Irritant pour les voies respiratoires |                       |                           |

**AW/E : 75 ml nécessaire par plaque**  
Ce tampon est préparé en mélangeant 100ml de solution AW et 170ml d'éthanol 96%

| Tampon AW/E   |                              |
|---|------------------------------|
| <i>Solutions:</i>   |                              |
|   | <i>Quantité (pour 190ml)</i> |
| AW Stock  | 70 ml                        |
| Ethanol 96%   | 120 ml                       |
|   |                              |
| H315 Irritant pour la peau<br>H319 Irritant pour les yeux<br>H335 Irritant pour les voies respiratoires<br>H226 Hautement Inflammable |                              |

**Tampon AE : 15ml nécessaire par plaque**  
Tampon d'éluion

| Tampon AE   |                       |                              |
|---|-----------------------|------------------------------|
| <i>Solutions:</i>   |                       |                              |
|   | <i>n° CAS produit</i> | <i>Quantité (pour 100ml)</i> |
| Tris 1M pH9   | Tris 1185-53-1        | 1 ml                         |
|   | HCl 7647-01-0         |                              |
| EDTA 0,5M pH9   | 600-00-4              | 0,1ml                        |
| H2O   |                       | 99 ml (qsp)                  |
|                    |                       |                              |
| H315 Irritant pour la peau<br>H319 Irritant pour les yeux<br>H335 Irritant pour les voies respiratoires |                       |                              |



Préparation du stock de RNase A (si nécessaire):

- Peser la ribonucléase A de Sigma (ref R5125)
- Ajouter de l'eau milliQ pour une concentration finale à 100mg/ml
- Préparer un bain-marie avec un b cher d'eau distillée. Lorsque l'eau bout, y plonger le tube avec la RNase (avec un grand volume de vide). Laisser 20min
- Aliquoter et conserver à -20 C

**3. PROTOCOLE**Prélèvements et Broyage

- Placer une bille d'acier de 4mm dans chaque tube de transfert allant contenir les échantillons
- Prélever en tube de transfert 3 jeunes feuilles d'apex non épanouies et placer ces feuilles à mi hauteur du tube.
- Immerger de moitié les plaques dans de l'azote liquide à (attention aux projections, porter des protections adaptées pour éviter les brûlures)
- Sortir les plaques de l'azote, laisser couler l'excédant d'azote liquide et placer les plaques dans le broyeur
- Broyage 20s à vitesse 15 quatre fois. Penser à changer de coté la plaque pour homogénéiser le broyage.
- Centrifuger les plaques 1min à 3000rpm pour culotter la poudre
- placer la plaque à -80 C pour stockage ou bien lancer l'extraction

Extraction

- Faire chauffer le bain-marie à 65 C, ajouter le sodium bisulfite au tampon d'extraction AP1 puis chauffer le tampon d'extraction au bain marie.
- >Si vous souhaitez supprimer les ARN de votre extraction, il faut ajouter au tampon d' xtraction 1 l de RNase A (100mg/ml) par échantillon soit 100 l de RNase pour 40ml de tampon AP1 (100 ch)
- Retirer les bouchons et déposer sous la hotte 400 L de tampon AP1 réchauffé à 65 C dans chaque tube.
- Remettre les bouchons puis mélanger efficacement de haut en bas puis par retournement la plaque. (15s)
- Mettre quelques instants la plaque au bain marie (cela d cong le les puits encore congelés) et agiter de nouveau la plaque.
- Centrifuger 1min à 3000rpm
- Ajouter 130  L de tampon AP2 par tube, bien agiter les plaques (15s)
- Centrifuger 1min à 3000rpm
- Placer la plaque 10min à -20 C (cette étape favorise la précipitation des protéines et peut-être prolongée sur la nuit)
- Centrifuger 5min à 4600g (attention pas 4000rpm)
- Transférer 300 L de surnageant dans une nouvelle plaque de transfert. Ce surnageant doit être net (400 l possible mais risque d'aspiration du culot...). Procéder par rangée de 8 tubes pour plus de confort et de visibilité.
- Les déchets de tampons contenus dans la plaque à jeter doivent être jetés dans le container « kit extraction » situé sous la hotte.*
- Ajouter 1,5vol (450 l) de AP3/E à chaque échantillon.
- Mélanger énergiquement la plaque 15s
- Centrifuger 1min à 3000rpm
- Placer la plaque de colonne WhatMan sur le Sbloc



6

- Transférer 600µl d'échantillon sur les colonnes (prendre en 2 ou 3 X le volume)
- Centrifuger 5min à 4600g (*un scellage des plaques avec un film poreux est possible, mais pas forcément utile*)
- Vider le Sbloc dans le container « guanidinium » et remettre la plaque de colonne dessus
- Ajouter 600µl de tampon AW/E à chaque colonne (ne pas avoir oublié l'éthanol dans l'AW)
- Centrifuger 15min à 4600g
- Vider le S Block dans le container « guanidinium »
- Placer la plaque de colonne sur la plaque d'élution (attention au sens de la plaque)
- Ajouter 50µl de tampon AE (qui peut être réchauffé à 65°C pour avoir une meilleure 1ère élution) à chaque colonne
- Laisser incubé 1min à température ambiante
- Centrifuger 3min à 4600rpm
- Ajouter 50µl de tampon AE à chaque colonne
- Laisser incubé 1min à température ambiante
- Centrifuger 3min à 4600rpm
- Faire une troisième élution dans une nouvelle plaque (*l'ADN sera moins concentré mais cette plaque pourra être idéale pour une utilisation PCR*)
- Sceller la plaque d'élution et la stocker à -20°C
- Nettoyer la salle et évacuer les déchets.

#### Nettoyage des colonnes de purification:

- Après deux ou trois lavages les filtres s'altèrent
- Immerger 10min dans l'eau osmotée préalablement chauffée à env 70°C
- Centrifuger 10min à 4600rpm sur un S-Block
- Mettre 100 µl de TE 1mM Tris; 0,1mM EDTA; préalablement chauffé à 70°C dans chaque colonne et incubé 10min
- Centrifuger 10min à 4600rpm sur un S-Block
- Mettre 40µl de tampon d'équilibration dans chaque colonne et incubé 10min
- tampon d'équilibration: dissoudre 43,83g de NaCl et 10,46g de MOPS (free acid) dans 800ml d'eau. Ajuster le PH à 7,0 . Ajouter 150ml d'isopropanol pur et compléter à 1L avec de l'eau.
- Centrifuger 10min à 4600rpm sur un S-Block

#### 4. REFERENCE DU MATERIEL







- Plaque de tubes de prélèvements: Chez Dutscher, tubes de transfert 1,2ml, barrettes de 8 tubes sur portoir ref 104412 pour 10 boîtes de 96
- Scellage de la plaque :
  - >Barrettes de 8 bouchons pour tubes de transfert : chez Dutscher, ref 104418, pour 120 barrettes (de quoi fermer 10 boîtes)
  - >Plaque de bouchons (alternative aux barrettes de bouchons) : **ref a mettre**
- Microplaques de filtrations :
  - >Whatman chez Dutscher ref 036020, en PS transparent filtre GF/B 800µl par puit. C carton de 25 plaques filtrantes. (Environ 1000euros les 25 plaques)
  - >Plaques filtrantes Pall Acroprep 96 puits, 350ml chez VWR, ref: 516.6894, vendues par lot de 5, 85euros P.U.H.T le lot
- Billes d'acier 4mm chez centre roulement, 10 rue George Besse, ZI Brezet Est, 63017 Clermont Ferrand cedex 2. Tel 04 73 98 82 82, fax 04 73 98 82 80
- Plaques d'élution:
  - >microplaques Greiner 96 puits PP fond conique: chez Dutscher, ref 651201, carton de 100 plaques.
  - >Plaque PCR simple





-S-Block kits Dneasy de Qiagen. Réutilisables (car plaque poubelle) avec lavage: 2 rinçages eau osmosée + 1 rinçage en alcool technique et séchage à l'envers.

-centrifugeuse : SORVALL Heraeus Multifuge 3 S-R




-Broyeur: Retsch MM300



## 5. HYGIENE ET SECURITE



| Produit                     | Pictogramme sécurité  | Phrase R et S  |
|-----------------------------|---|--|
| Tris                        |    | R : 36/37/38 Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau.<br>S : 26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement avec de l'eau et consulter un spécialiste. 36 Porter un vêtement de protection approprié   |
| EDTA                        |    | R : 22 Nocif en cas d'ingestion.   |
| NaCl                        | Pas de danger   |  |
| SDS                         | <br> | R : 36/37/38 Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. 11 Facilement inflammable. 42 Peut entraîner une sensibilisation par inhalation. 41 Risque de lésions oculaires graves. 20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.<br>S : 26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. 36/37/39 Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. 22 Ne pas respirer les poussières. |
| PVP                         |    | S : 22 Ne pas respirer les poussières. 24/25 Éviter le contact avec la peau et les yeux.   |
| Bisulfite de sodium Na2S2O5 |    | R : 22 Nocif en cas d'ingestion.<br>31 Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique. 37 Irritant pour les voies respiratoires. 41 Risque de lésions oculaires graves.<br>S : 26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. 39 Porter un appareil de protection des yeux/du visage.   |


|                          |   |   |
|--------------------------|---|---|
| KAC acétate de potassium |    | <p style="text-align: right;">8</p> <p>R : 36/37/38 Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. 25 Toxique en cas d'ingestion. 23/24/25 Toxique par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion. 21 Nocif par contact avec la peau.</p> <p>S : 26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. 24/25 Éviter le contact avec la peau et les yeux. 45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette) 36/37/38 Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.</p> |
| Acide acétique           |    | <p>R 42 Peut entraîner une sensibilisation par inhalation. 35 Provoque de graves brûlures. 10 Inflammable. 36/38 Irritant pour les yeux et la peau.</p> <p>S 26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste 36/37/39 Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage 45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette). 23 Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols (terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant). 24/25 Éviter le contact avec la peau et les yeux.</p>      |
| Guanidinium Chloride     |  | <p>R 22 Nocif en cas d'ingestion. -36/38 Irritant pour les yeux et la peau.</p> <p>S 22 Ne pas respirer les poussières. -26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. 36 Porter un vêtement de protection approprié.</p>   |
| Ethanol                  |  | <p>R : 11 Inflammable.</p> <p>S : 7 Conserver le récipient bien fermé. 16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles – Ne pas fumer.</p>  |


## 6. ETIQUETTES POUR LES SOLUTIONS

|   |                                 |                              |
|---|---------------------------------|------------------------------|
| Nom:  |                                 | Date :                       |
| <b>Tampon AP1</b>   |                                 |                              |
| <b>Stockage température ambiante</b>  |                                 |                              |
| <i>Solutions:</i>   | <i>n° CAS produit</i>           | <i>Quantité (pour 500ml)</i> |
| Tris HCl 1 M pH 8   | Tris 1185-53-1<br>HCl 7647-01-0 | 50 ml                        |
| EDTA 0,5M pH 8  | 600-00-4                        | 50 ml                        |
| NaCl 2,5 M  | 7647-14-5                       | 100 ml                       |
| SDS 20%   | 151-21-3                        | 31,5 ml                      |
| PVP 40 000  | 9003-39-8                       | 5 g                          |
| H2O   |                                 | 268 ml (qsp)                 |
|    |                                 |                              |
| a mettre au dernier moment  |                                 |                              |
| Sodium bisulfite  | 7681-57-4                       | 5 g                          |
| H312 : Nocif par contact cutané   |                                 |                              |
| H315 Irritant pour la peau  |                                 |                              |
| H319 Irritant pour les yeux   |                                 |                              |
| H335 Irritant pour les voies respiratoires  |                                 |                              |
| Nom:  |                                 | Date :                       |
| <b>Tampon AP3/E</b>   |                                 |                              |
| <b>Stockage température ambiante</b>  |                                 |                              |
| <i>Solutions:</i>   | <i>n° CAS produit</i>           | <i>Quantité (pour 900ml)</i> |
| Guanidinium Chloride  | 50-01-1                         | 223,5 g                      |
| Ethanol 96%   | 64-17-5                         | 600 ml                       |
| H2O   |                                 | 300 ml (qsp)                 |
|   |                                 |                              |
| H302 : Nocif en cas d'ingestion   |                                 |                              |
| H315 Irritant pour la peau  |                                 |                              |
| H319 Irritant pour les yeux   |                                 |                              |
| H226 Hautement Inflammable  |                                 |                              |

|   |                              |        |
|---|------------------------------|--------|
| Nom:  |                              | Date : |
| <b>Tampon AW/E</b>  |                              |        |
| <b>Stockage température ambiante</b>  |                              |        |
| <i>Solutions:</i>   | <i>Quantité (pour 270ml)</i> |        |
| AW Stock  | 100 ml                       |        |
| Ethanol 96%   | 170 ml                       |        |
|   |                              |        |
| H315 Irritant pour la peau  |                              |        |
| H319 Irritant pour les yeux   |                              |        |
| H335 Irritant pour les voies respiratoires  |                              |        |
| H226 Hautement Inflammable  |                              |        |

|  |                       |                              |
|--|-----------------------|------------------------------|
| Nom:   |                       | Date :                       |
| <b>Tampon AP2</b>  |                       |                              |
| <b>Stockage température ambiante</b>   |                       |                              |
| <i>Solutions:</i>  | <i>n° CAS produit</i> | <i>Quantité (pour 200ml)</i> |
| KAc 5M   | 127-08-2              | 120 ml                       |
| Acide acétique Glacial   | 64-19-7               | 23 ml                        |
| H2O  |                       | 57 ml (qsp)                  |
|   |                       |                              |
| H226 Hautement Inflammable   |                       |                              |
| H314 Risque de brûlure pour la peau et les yeux  |                       |                              |

|   |                                 |                           |
|---|---------------------------------|---------------------------|
| Nom:  |                                 | Date :                    |
| <b>Tampon AW Stock</b>  |                                 |                           |
| <b>Stockage température ambiante</b>  |                                 |                           |
| <i>Solutions:</i>   | <i>n° CAS produit</i>           | <i>Quantité (pour 1L)</i> |
| Tris HCl 1 M pH 8   | Tris 1185-53-1<br>HCl 7647-01-0 | 22,5 ml                   |
| EDTA 0,5M   | 600-00-4                        | 200µl                     |
| KAc 5M  | 127-08-2                        | 32 ml                     |
| H2O   |                                 | 945,3 ml (qsp)            |
|  |                                 |                           |
| H315 Irritant pour la peau  |                                 |                           |
| H319 Irritant pour les yeux   |                                 |                           |
| H335 Irritant pour les voies respiratoires  |                                 |                           |

|   |                                 |                              |
|---|---------------------------------|------------------------------|
| Nom:  |                                 | Date :                       |
| <b>Tampon AE</b>  |                                 |                              |
| <b>Stockage température ambiante</b>  |                                 |                              |
| <i>Solutions:</i>   | <i>n° CAS produit</i>           | <i>Quantité (pour 100ml)</i> |
| Tris HCl 1 M pH 9   | Tris 1185-53-1<br>HCl 7647-01-0 | 1 ml                         |
| EDTA 0,5M pH9   | 600-00-4                        | 0,1ml                        |
| H2O   |                                 | 99 ml (qsp)                  |
|  |                                 |                              |
| H315 Irritant pour la peau  |                                 |                              |
| H319 Irritant pour les yeux   |                                 |                              |
| H335 Irritant pour les voies respiratoires  |                                 |                              |



## Annexe 2 : extraction de l'ADN du gel d'agarose

## NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

## 5.2 DNA extraction from agarose gels

## Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

## 1 Excise DNA fragment/solubilize gel slice

*Note:* Minimize UV exposure time to avoid damaging the DNA. Refer to section 2.5 for more tips on agarose gel extraction.

Take a clean scalpel to excise the DNA fragment from an agarose gel. Remove all excess agarose.



! Determine the weight of the gel slice and transfer it to a clean tube.

For each 100 mg of agarose gel < 2% add 200 µL Buffer NTL.

+ 200 µL NTL  
per  
100 mg gel

For gels containing > 2% agarose, double the volume of Buffer NTL.



Incubate sample for 5–10 min at 50 °C. Vortex the sample briefly every 2–3 min until the gel slice is completely dissolved!

50 °C  
5–10 min

## 2 Bind DNA

Place a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.



Load sample

Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



11,000 x g  
30 s

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.

## 3 Wash silica membrane

Add 700 µL Buffer NT3 to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for 30 s at 11,000 x g. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



+ 700 µL NT3



11,000 x g  
30 s

## NucleoSpir® Gel and PCR Clean-up

**Recommended:** Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and low  $A_{260}/A_{280}$  (see section 2.7 for detailed information).



+ 700 µL NT3

11,000 x g  
30 s

#### 4 Dry silica membrane

Centrifuge for 1 min at 11,000 x g to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



*Note:* Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.

11,000 x g  
1 min

#### 5 Elute DNA

Place the NucleoSpir® Gel and PCR Clean-up Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add 15–30 µL Buffer NE and incubate at room temperature (18–25 °C) for 1 min. Centrifuge for 1 min at 11,000 x g.



+ 15–30 µL NE

RT  
1 min11,000 x g  
1 min

*Note:* DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.

### Annexe 3 : Script pour le mapping des séquences NGS sur la nouvelle référence (création de fichiers. bam)

```

#!/bin/bash
# cbengagi - 16/05/2017

chemins et variables à modifier avant lancement du script
emplacement du dossier d'ou est lancé le script
cd /data_nasl/home/gafl/cbengagi/tcha/mapping_vs_Pp20_patch_Alnem_01
emplacement des données après selqual
Rep_fastq="/data/wgs/rosaceae/Prunus_persica/PeachReSeq/Lauranne/selqual"
reference
Ref_bowtie="/data_0/proj/G2IP/Pecheur/RMja/patched_ref/Prupe20_patch_Alnem/Prupe20_patch_Alnem_01/bowtie2/Prupe20_patch_Alnem_01_ext"
Ref_fai="/data_0/proj/G2IP/Pecheur/RMja/patched_ref/Prupe20_patch_Alnem/Prupe20_patch_Alnem_01/bowtie2/Prupe20_patch_Alnem_01_ext.fai"
fichier fastq R1
fastqR1="Lauranne_S8_L005_R1_001"
#fichier fastq R2
fastqR2="Lauranne_S8_L005_R2_001"
#nom du fichier bam et sam
fibam="Lauranne_vs_Prupe20_patch_Alnem_01_ext"
#####

# mapping paired sequences

/usr/local/bin/bowtie2 --end-to-end --score-min L,-0.7,-0.7 -x $Ref_bowtie -1 ${Rep_fastq}/${fastqR1}_cutad_p3_ql20_p_PF.fastq -2 ${Rep_
fastq}/${fastqR2}_cutad_p3_ql20_p_PF.fastq -S ${fibam}.sam -p 6 --fr -X 600 > bowtie2.stdout 2> bowtie2.stderr
samtools view -bS -t $Ref_fai ${fibam}.sam > ${fibam}.bam
samtools sort -o ${fibam}.sorted.bam ${fibam}.bam

samtools sort ${fibam}.bam ${fibam}.sorted
samtools index ${fibam}.sorted.bam
samtools idxstats ${fibam}.sorted.bam > ${fibam}.sorted.idxstats

echo "mapping des fichiers fastq R1 et R2 $fastqR1 et $fastqR2 " > infos_mapping_${fibam}.txt
date >> infos_mapping_${fibam}.txt
echo " traitement des reads: utilisation de cutadapt et de selqualfast " >> infos_mapping_${fibam}.txt
echo "references utilisées : $Ref_bowtie et $Ref_fai " >> infos_mapping_${fibam}.txt

```

## Annexe 4 : Scripts pour la création du patch avec insertion de séquence bac sous linux

```

#!/bin/bash
# jpb - 18/04/2017
# objectif : genome Pecher avec patch sur chr 7 pour insérer le BAC 76H19 de P cerasifera
#           ce BAC contient l'allèle Ma1 résistant aux nématodes
#           positions : cf /data_0/proj/G2IP/Pecher/RMja/blast
#
#
# lancement par nohup ./lance_build.bsh &

# Quelques variables
RepBAC="/data_0/proj/G2IP/Pecher/RMja/jpbouchet/doc"
RepProg="/usr/local/prive/bi/gafl"
RepRefPp="/db/seq/public/phytozome/peach/v2.1/Assembly_Phytozome"
Rep76H19_01="/data_0/proj/G2IP/Pecher/RMja/patched_ref/Prupe20_patch_76H19/Prupe20_patch_76H19_01"

cd $Rep76H19_01

NewFicTmp="Prupe20_patch_76H19_01_ext.tmp"
NewFicFasta="Prupe20_patch_76H19_01_ext.fa"
NewFicStats="Prupe20_patch_76H19_01_ext.stats"

# Pp01 à Pp06 inchangés
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp01.fa > $NewFicTmp
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp02.fa >> $NewFicTmp
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp03.fa >> $NewFicTmp
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp04.fa >> $NewFicTmp
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp05.fa >> $NewFicTmp
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp06.fa >> $NewFicTmp

# Pp07 modifié pour insérer le BAC 76H19
# blastn // Sbjct : 10528543 10528411 22388614 - // Query : 4 138 287717 + // S=222 E=7e-54 I=130/135 (96%) Gaps=2/135 (1%)
# blastn // Sbjct : 10251508 10251010 22388614 - // Query : 287210 287717 287717 + // S=605 E=1e-169 I=468/515 (90%) Gaps=23/515 (4%)

# attention : ce bac contient Plasposon NKBOR
# Sbjct: gnl|uv|AF310136.1:224-2163 Plasposon NKBOR
# blastn // Sbjct : 1681 1750 1940 + // Query : 207781 207850 287717 + // S=139 E=3e-31 I=70/70 (100%)
# blastn // Sbjct : 50 1307 1940 + // Query : 207847 209104 287717 + // S=2478 E=0.0 I=1256/1258 (99%)

```



```

# Sbjct: gnl|uv|AF310136.1:224-2163 Plasposon NKB0R
# blastn // Sbjct : 1681 1750 1940 + // Query : 207781 207850 287717 + // S=139 E=3e-31 I=70/70 (100%)
# blastn // Sbjct : 50 1307 1940 + // Query : 207847 209104 287717 + // S=2478 E=0.0 I=1256/1258 (99%)

echo ">Pp07" >> $NewFicTmp
${RepProg}/N_provider.py -count 50 >> $NewFicTmp

${RepProg}/fetch_segment -db ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp07.fa -no_header -id Pp07 -pi 1 -pf 10251009 -lg 200 >> $NewFicTmp

${RepProg}/N_provider.py -count 100 >> $NewFicTmp

${RepProg}/fetch_segment -db ${RepBAC}/genomic_76H19.fa -id FM253563.1 -no_header -pi 209105 -pf 287717 -lg 200 -rev_cpl >> $NewFicTmp

${RepProg}/N_provider.py -count 100 >> $NewFicTmp

${RepProg}/fetch_segment -db ${RepBAC}/genomic_76H19.fa -id FM253563.1 -no_header -pi 1 -pf 207780 -lg 200 -rev_cpl >> $NewFicTmp

${RepProg}/N_provider.py -count 100 >> $NewFicTmp

${RepProg}/fetch_segment -db ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp07.fa -no_header -id Pp07 -pi 10528544 -lg 200 >> $NewFicTmp

${RepProg}/N_provider.py -count 50 >> $NewFicTmp

# Pp08 et scaffolds inchangés
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_Pp08.fa >> $NewFicTmp
cat ${RepRefPp}/Ppersica_298_v2.0_scaffolds.fa >> $NewFicTmp

# extensions
# génome chloroplastique
cat ${RepRefPp}/GAFL_extension/sequence_chloroplast_014697.1_sh.fa >> $NewFicTmp

# ajout génome mitochondrial Malus
cat /db/seq/public/ncbi/mitochondrion/mitochondrion_Malus.fna >> $NewFicTmp

${RepProg}/filtre_fic_fasta.py -lg 200 < $NewFicTmp > $NewFicFasta

calculate_stats -o $NewFicStats $NewFicFasta

```

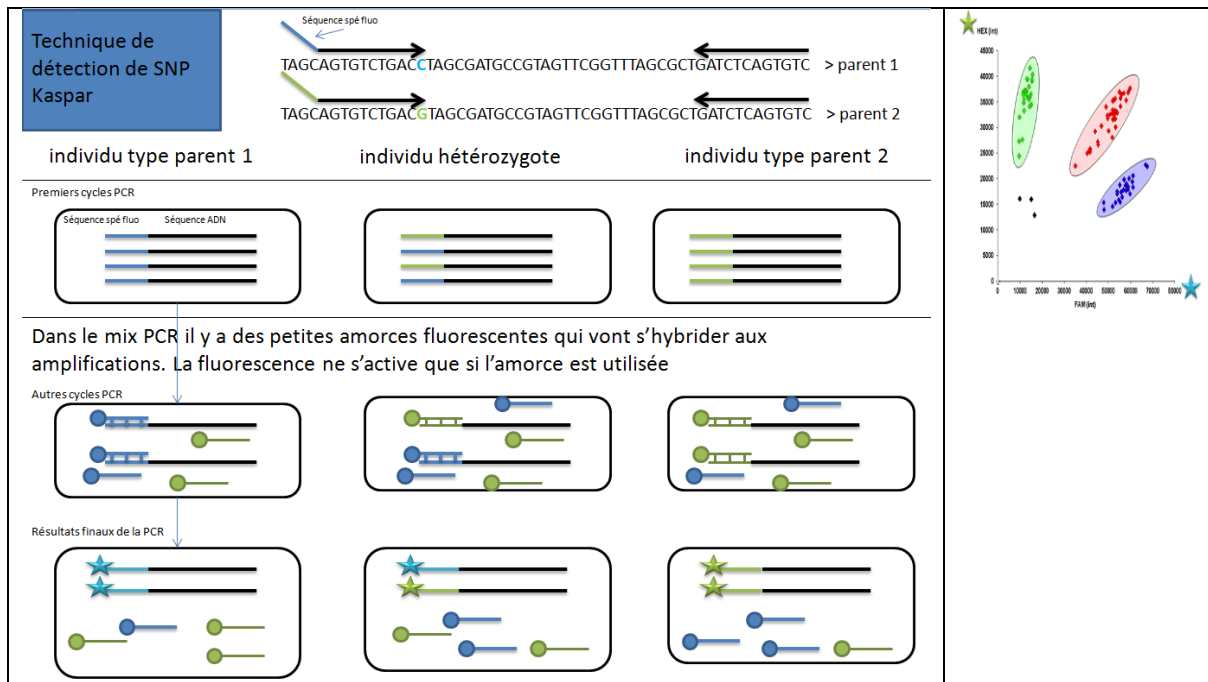
## Annexe 5 : résultats de Prédiction de gène avec le logiciel Augustus

|             |        |        |      |   |   |
|-------------|--------|--------|------|---|---|
| gene        | 133116 | 146784 | 0.01 | + | . |
| transcript  | 133116 | 146784 | 0.01 | + | + |
| tss         | 133116 | 133116 | .    | + | . |
| exon        | 133116 | 133424 | .    | + | . |
| start_codon | 133336 | 133338 | .    | . | + |
| intron      | 133425 | 133536 | 0.18 | + | . |
| intron      | 133612 | 133776 | 0.18 | + | . |
| intron      | 133957 | 134641 | 0.22 | + | . |
| intron      | 134981 | 135660 | 0.49 | + | . |
| intron      | 135910 | 136267 | 0.14 | + | . |
| intron      | 136362 | 136470 | 0.35 | + | . |
| intron      | 136595 | 138735 | 0.11 | + | . |
| intron      | 139295 | 139936 | 0.98 | + | . |
| intron      | 141045 | 141288 | 1    | + | . |
| intron      | 141568 | 141707 | 1    | + | . |
| intron      | 142677 | 142779 | 0.97 | + | . |
| intron      | 143455 | 143554 | 0.99 | + | . |
| intron      | 144344 | 144477 | 1    | + | . |
| intron      | 145108 | 145204 | 0.99 | + | . |
| intron      | 145820 | 146056 | 0.94 | + | . |
| CDS         | 133336 | 133424 | 0.2  | + | 0 |
| CDS         | 133537 | 133611 | 0.19 | + | 1 |

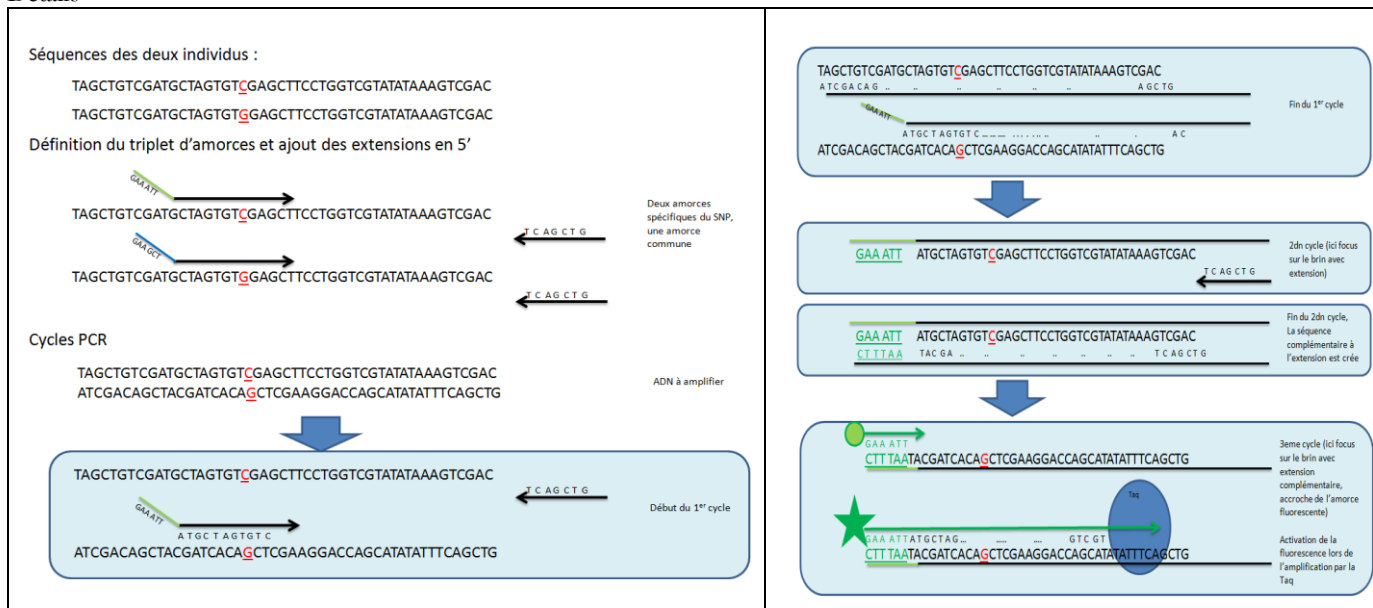
Annexe 5

|  |                              |
|--|------------------------------|
| <b>MODE OPERATOIRE</b>   |                              |
| <b>Utilisation de la technique KASP™ (Kompetitive Allele Specific PCR)</b> | <b>UR GAFL BioMol</b>        |
| <b>LGC Genomics</b>  | <b>Version du 18/07/2016</b> |

1- Principe



Détails



## 2- Design d'amorce

Les amorces sont soit dessinées par LGC Genomics (desing 50 euros l'amorce + 70 euros frais de port quelque soit le nombre d'amorce), soit dessinées à la main.

Condition pour le design des amorces (site WASP <http://bioinfo.biotec.or.th/WASP> qui permet d'identifier directement le trio d'amorce; primer blast <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, ou primer 3 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>)

- > Taille des produits d'amplification : le plus petit possible min: 45pb max: 90pb
- > Tm de 60°C -> min: 53°C max: 77°C (le plus souvent les amorces sont définies entre 53-68°).
- > Taille des amorces: 25 bases min: 20 max: 32 (sans compter les extensions)
- >Max Self Complementarity: 7 ; Max 3' Self Complementarity: 3

Si design avec primer 3 ou primer blast ; imposer le desing de la forward pour que la dernière base corresponde au snp. **Vérifiez la spécificité de l'amorce par Blast** sur votre génome de référence (pour le génome du pécher sur GDR), **Les amorces Kaspar doivent être spécifiques**. Si vous devez dessiner l'amorce en antisens vous pouvez utiliser le site [http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) pour reverse compléter votre séquence. Choisir la reverse la plus spécifique possible parmi celle dessinées par Blast, et éviter les self complémenatrity supérieures à 5 (risque d'auto hybridation de l'amorce)

Rajouter les extensions pour les deux forward pour la commande (Les amorces ne sont pas à commander fluorescentes)

Extension à mettre en 5', qui correspond à l'amorce marquée en FAM (bleu) du mix Kasp F1:  
GAAGGTGACCAAGTTCATGCT

Extension à mettre en 5' qui correspond à l'amorce marquée en HEX (vert) du mix Kasp F2 :  
GAAGGTCCGAGTCAACGGATT

## 3- Manip

### 3.1-Dilutions d'amorces

Pour les amorces dessinées « à la main » ; resuspendre les sols mère a 100µM avec de l'eau UP, puis faire un mix unique d'amorces avec les concentrations suivantes :

|          | [finale mix] | Volume |
|----------|--------------|--------|
| Eau UP   |              | 46 µl  |
| F1 100µM | 12µM         | 12 µl  |
| F2 100µM | 12µM         | 12 µl  |
| R 100µM  | 30µM         | 30 µl  |

Remarques:

-Pour les amorces réalisées par KASP les 2 amorces forward et la reverse sont déjà mélangées

### 3.2-PCR

7

Attention à cause dimères d'amorces courant avec la technique kaspar toujours mettre des témoins eau. Le mix Kaspar craint la lumière et doit être maintenu au congél et sortis juste pour la manip (présence de Taq). La plaque PCR doit être scellée avec un film transparent pour PCRQ (clear seal). Il est possible de préparer sa plaque PCR, de la sceller et de conserver la plaque 1 jour au congél avant de lancer la PCR en cas de problème de planning PCR.

>Mix en plaque 384 :

| <i>mix 384</i>    | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i> | <i>1 ech</i> |
|-------------------|-------------------|-----------------|--------------|
| <i>ADN 5ng/µl</i> |                   |                 | 2            |

|                |               |                              |       |
|----------------|---------------|------------------------------|-------|
| <i>mix 2x</i>  | 2x            | 1x ; 2,5mM MgCl <sub>2</sub> | 2     |
| <i>amorces</i> | F 12μM R 30μM | F 0,16μM R 0,41μM            | 0,055 |

|  |                   |                              |                     |                    |
|--|-------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|
| <i>mix 384 « version GAFL » pour distri rigole</i> | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i>              | <i>1 ech</i>        | <i>96 ech</i>      |
| <i>ADN 5ng/μl</i>                                  |                   |                              | 2                   |                    |
| <i>mix 2x</i>                                      | 2x                | 1x ; 2,5mM MgCl <sub>2</sub> | 1.5μl mix 0.7μl eau | 160μl mix 76μl eau |
| <i>amorces</i>                                     | F 12μM R 30μM     | F 0,16μM R 0,41μM            | 0,055               | 5.4μl              |

>Mix en plaque 96

|                                   |                   |                              |              |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------------|--------------|
| <i>mix 96_recommandations LGC</i> | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i>              | <i>1 ech</i> |
| <i>ADN 5ng/μl</i>                 |                   |                              | 4            |
| <i>mix 2x</i>                     | 2x                | 1x ; 2,5mM MgCl <sub>2</sub> | 4            |
| <i>amorces</i>                    | F 12μM R 30μM     | F 0,16μM R 0,41μM            | 0,11         |

|   |                   |                                 |              |
|---|-------------------|---------------------------------|--------------|
| <i>mix 96 MgCl<sub>2</sub> 2.5mM « version GAFL »</i> | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i>                 | <i>1 ech</i> |
| <i>ADN 10ng/μl</i>                                    | 10ng/μl           | 20ng                            | 2            |
| <i>mix 2x</i>   | 2x                | 0,5x ; 1,25mM MgCl <sub>2</sub> | 2            |
| <i>eau</i>  |                   |                                 | 3.2          |
| <i>MgCl<sub>2</sub></i>                               | 25mM              | 1.25mM                          | 0.8          |
| <i>amorces</i>  | F 12μM R 30μM     | F 0,16μM R 0,41μM               | 0,11         |

Il est possible d'utiliser 2μl de mix kaspar pour faire une PCR 96 avec un volume final de 8. Effectivement cela dilue le mix en 0.5x. Normalement il faudrait utiliser 4μl de mix en PCR 96. Les tests ont pour le moment montré que la PCR en 0.5x marche, mais réduit par 2 l'intensité des fluorochromes. (L'intensité résiduelle des blancs est aussi diminuée par deux)

En cas de problème sur la manip voir au point 6 les améliorations possibles

>Programmes PCR : (rem : annealing et élongation ont été regroupées en une seule étape)

La plaque en sortie de PCR doit être placée au frigo pour une lecture rapide ou au congélateur pour être conservée. Ne pas la laisser à la lumière. Il est possible d'utiliser un programme touch down ou bien une température fixe (60°C ou bien 55°C ou une autre).

|                          |           |                |           |
|--------------------------|-----------|----------------|-----------|
| Programme TouchDown Kasp |           | Kaspar_60c_40x |           |
| 94°C                     | 15 min    | 94°C           | 15 min    |
| 94°C                     | 20s       | 94°C           | 20s       |
| 65-57°C (-0,8°C/cycle)   | 60s       | 60°C           | 60s       |
|                          | 10 cycles |                | 40 cycles |
| 94°C                     | 20s       | 15°C           | for ever  |
| 57°C                     | 60s       |                |           |
|                          | 30 cycles |                |           |
| 15°C                     | for ever  |                |           |

Il arrive fréquemment que les résultats soient trop faible et les nuages de points mal séparés ; dans ce cas relancer une PCR dite « recycling », qui consiste en 10 cycles PCR supplémentaires.

|                  |           |
|------------------|-----------|
| Kaspar_recycling |           |
| 94°C             | 2 min     |
| 94°C             | 20s       |
| 55°C             | 60s       |
|                  | 10 cycles |
| 15°C             | for ever  |

## 4. Lecture par appareil Perking Elmer avec Wallac EnVision Manager

L'appareil de lecture est de la société Perkin Elmer. Wallac EnVision™ ;2103 Multilabel Reader

Allumer le PC et entrer dans sa session perso. Ouvrir le logiciel Wallac NVision Manager.

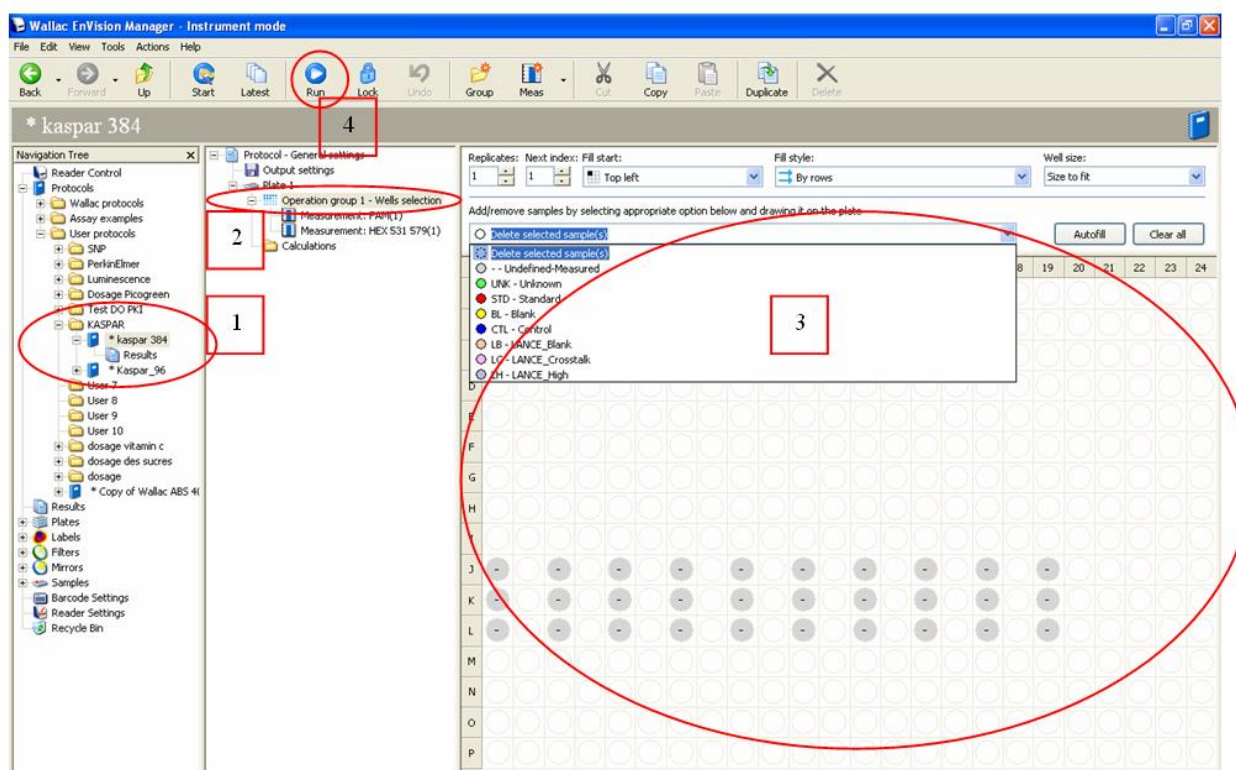
Normalement le robot ouvre sa porte et sort le plateau pour la plaque à lire. S'il ne le fait pas ou si vous voulez refermer le plateau il faut appuyer sur « load »

Rem : la plaque 384 « flotte » dans le plateau, mais lorsque que l'on fait refermer l'appareil il fixe la plaque.

Sélectionner le protocole Kaspar adéquat (plaque 384 ou plaque 96) (1 et 2)

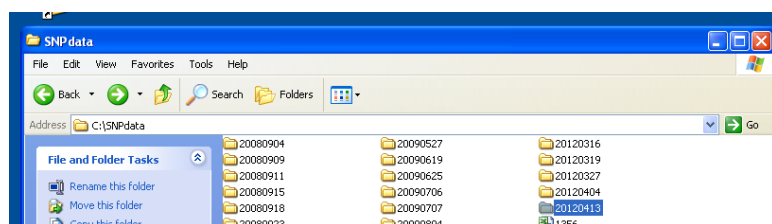
Sélectionner en gris les puits à mesurer par le robot. Il faut sélectionner les puits correspondant à un seul marqueur (3) (et relancer la lecture de la plaque autant de fois que de marqueurs ; la lecture de la plaque en entier est faisable mais cela pose un problème pour l'interprétation des résultats après). Une fois tous les puits identifiés appuyer sur « Run » (4)

Il faut environ 20-30s pour l'appareil pour lire la plaque ; à la fin de la lecture un fichier excel s'ouvre directement.

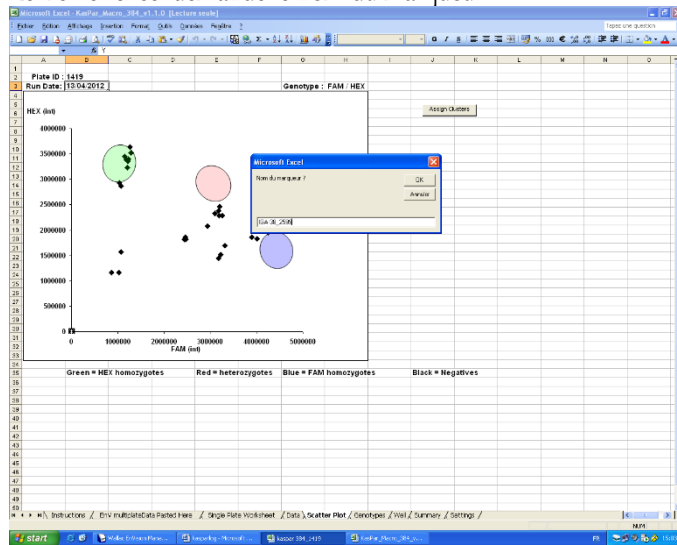


## 5. Lecture des résultats avec la macro

Le fichier excel avec sa macro (F. Bitton) est directement disponible à la fin de la lecture du run. Si vous avez plusieurs fichiers à chercher ils sont stockés dans C:\SNPData dans des dossiers à la date du jour. Il y a pour chaque run deux fichiers : le fichier brut .csv et le fichier excel avec la macro.



Le fichier excel demande le nom du marqueur



Le fichier se compose de plusieurs onglets :

- « instructions » pour l'utilisation du fichier
- « EnV multiplateData Pasted Here » et « Single Plate Worksheet » sont des onglets avec les données brutes des lectures aux deux longueurs d'ondes vic et fam
- l'onglet « data » regroupe les données de fluorescence vic et fam ainsi que les données à placer pour mettre les témoins
- « Scatter Plot » est le fichier graphique des résultats
- « Genotypes » est le fichier de résultats
- « Well » représente la plaque 384 avec les couleurs observées

1) Onglet EnV multiplateData Pasted Here  
Compter le « assay ID » en E57 avec le nom du marqueur

2) Onglet scatter plot.  
Il faut arranger les cercles afin d'encercler les nuages de points et cliquer sur « assign Cluster »



3) onglet well  
Déterminer d'après son plan de plaque quel est l'allèle fam et l'allèle vic

| A  | B                                   | C           | D        | E        | F        | G        | H        | I        | J        | K        | L        | M        | N        | O        | P        | Q        | R        | S        | T        | U        |
|----|-------------------------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1  | Name: 13/04/2012 Operator: ccorland |             |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 2  | Plate ID:                           | 1420        |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 3  | Marker:                             | VIC/38_4751 |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 4  | Genotype:                           | FAM / VIC   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| 5  | 1                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 6  | 2                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 7  | 3                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 8  | 4                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 9  | 5                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 10 | 6                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 11 | 7                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 12 | 8                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 13 | 9                                   | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |
| 14 | 10                                  | Negative    | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative | Negative |

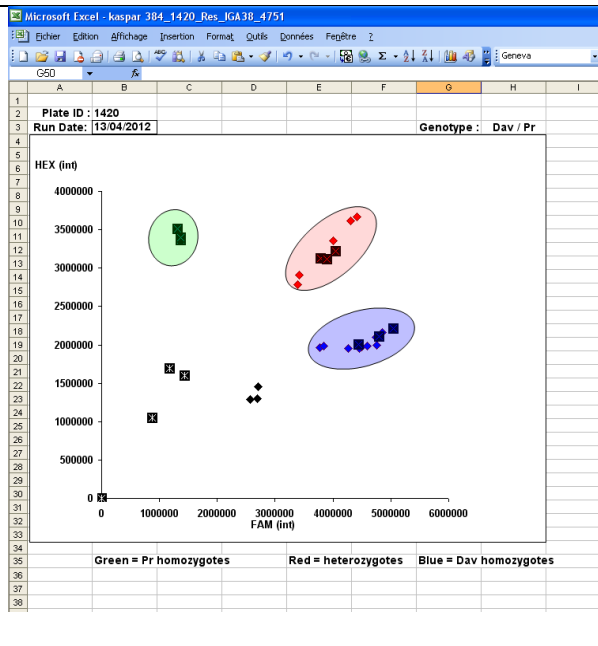


4) onglet data

Indiquer le nom des génotypes correspondant aux couleurs, et indiquer les coordonnées des témoins positifs et négatifs (cela fait qu'ils vont apparaître en carrés dans le scatter plot)

L'onglet génotype regroupe les données finales

| Well ID | Sample ID     | Int (Int) | Genotype |
|---------|---------------|-----------|----------|
| A01     | IGA38_4751.1  | 0,0       | Negative |
| B01     | IGA38_4751.2  | 0,0       | Negative |
| C01     | IGA38_4751.3  | 0,0       | Negative |
| D01     | IGA38_4751.4  | 0,0       | Negative |
| E01     | IGA38_4751.5  | 1317867,0 | PrPr     |
| F01     | IGA38_4751.6  | 3566792,0 | PrPr     |
| G01     | IGA38_4751.7  | 1360556,0 | PrPr     |
| H01     | IGA38_4751.8  | 3397714,0 | PrPr     |
| I01     | IGA38_4751.9  | 0,0       | Negative |
| J01     | IGA38_4751.10 | 0,0       | Negative |
| K01     | IGA38_4751.11 | 0,0       | Negative |
| L01     | IGA38_4751.12 | 0,0       | Negative |
| M01     | IGA38_4751.13 | 0,0       | Negative |
| N01     | IGA38_4751.14 | 0,0       | Negative |
| O01     | IGA38_4751.15 | 0,0       | Negative |
| P01     | IGA38_4751.16 | 0,0       | Negative |
| A02     | IGA38_4751.17 | 0,0       | Negative |
| B02     | IGA38_4751.18 | 0,0       | Negative |
| C02     | IGA38_4751.19 | 0,0       | Negative |
| D02     | IGA38_4751.20 | 0,0       | Negative |
| E02     | IGA38_4751.21 | 0,0       | Negative |
| F02     | IGA38_4751.22 | 0,0       | Negative |
| G02     | IGA38_4751.23 | 0,0       | Negative |
| H02     | IGA38_4751.24 | 0,0       | Negative |
| I02     | IGA38_4751.25 | 0,0       | Negative |
| J02     | IGA38_4751.26 | 0,0       | Negative |
| K02     | IGA38_4751.27 | 0,0       | Negative |
| L02     | IGA38_4751.28 | 0,0       | Negative |



| Well ID | ID Sample     | Results    | Genotype Code      |
|---------|---------------|------------|--------------------|
| A01     | IGA38_4751.1  | 0 Negative | 0 = Negative       |
| B01     | IGA38_4751.2  | 0 Negative | 1 = Homo FAM       |
| C01     | IGA38_4751.3  | 0 Negative | 2 = Homo HEX       |
| D01     | IGA38_4751.4  | 0 Negative | 3 = Hetero FAM/HEX |
| E01     | IGA38_4751.5  | 2 PrPr     |                    |
| F01     | IGA38_4751.6  | 0 Negative |                    |
| G01     | IGA38_4751.7  | 2 PrPr     |                    |
| H01     | IGA38_4751.8  | 2 PrPr     |                    |
| I01     | IGA38_4751.9  | 0 Negative |                    |
| J01     | IGA38_4751.10 | 0 Negative |                    |
| K01     | IGA38_4751.11 | 0 Negative |                    |
| L01     | IGA38_4751.12 | 0 Negative |                    |
| M01     | IGA38_4751.13 | 0 Negative |                    |
| N01     | IGA38_4751.14 | 0 Negative |                    |
| O01     | IGA38_4751.15 | 0 Negative |                    |
| P01     | IGA38_4751.16 | 0 Negative |                    |
| A02     | IGA38_4751.17 | 0 Negative |                    |
| B02     | IGA38_4751.18 | 0 Negative |                    |
| C02     | IGA38_4751.19 | 0 Negative |                    |
| D02     | IGA38_4751.20 | 0 Negative |                    |
| E02     | IGA38_4751.21 | 0 Negative |                    |
| F02     | IGA38_4751.22 | 0 Negative |                    |
| G02     | IGA38_4751.23 | 0 Negative |                    |
| H02     | IGA38_4751.24 | 0 Negative |                    |
| I02     | IGA38_4751.25 | 0 Negative |                    |
| J02     | IGA38_4751.26 | 0 Negative |                    |
| K02     | IGA38_4751.27 | 0 Negative |                    |
| L02     | IGA38_4751.28 | 0 Negative |                    |

6. Conditions particulières PCR et améliorations possibles (idées en vrac et retours de manip) :

Les informations sur le kit et la manip Kaspar sont indiquées dans le manuel [http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP\\_manual.pdf](http://www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP_manual.pdf)

Un test réalisé sur des ADN dilué dans de l'eau et du TE10.1 a été réalisé, et a montré qu'il fallait mieux éviter de mettre du TE pour diluer les ADN

Pour arranger la manip il est possible de :

- Utiliser le recycling (utile pour un grand nombre de marqueurs dans l'équipe G2IP, on s'est rendu compte que pour certains marqueurs il fallait 40 cycles et pour d'autres 55cycles PCR ; mais un marqueur qui fonctionne bien à 40 cycles peut être pitoyable à 55 cycles)
- Modifier le cycle PCR (des résultats parfois bien meilleur que d'utiliser le TD ; l'équipe tomate ne fonctionne plus qu'avec un cycle a 57°c fixe) ; éventuellement tester le marqueur avec une PCR gradient de 53 à 65°c
- augmenter la concentration d'amorce (utilisé par F bitton et Justine gricourt avec succès, pour des amorces qui avaient été testées et marchaient, mais ne marchaient plus sur les adn d'une nouvelle extraction) par 2

-augmenter la concentration de MgCl<sub>2</sub> (écarter ou rapproche les nuages de points, et améliore l'intensité PCR)

-Utiliser du PVP (pour le moment pas d'amélioration constaté)

-si vous travaillez avec un mix 96 « GAFL » et que cela ne fonctionne pas, essayer avec un mix « recommandé par LGC ». Cela utilise deux fois plus de mix (ou bien il faut travailler en 384). F Bitton a eu des différences de résultats notables.

-Augmentation 2 x de la concentration d'amorce

| <i>mix 96 MgCl<sub>2</sub> 2.5mM 2x amorce</i> | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i>                 | <i>1 ech</i> |
|--|-------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>ADN 10ng/μl</b>                             | 10ng/μl           | 20ng                            | 2            |
| <b>mix 2x</b>                                  | 2x                | 0,5x ; 1,25mM MgCl <sub>2</sub> | 2            |
| <b>eau</b>                                     |                   |                                 | 2.98         |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>                        | 25mM              | 1.25mM                          | 0.8          |
| <b>amorces</b>                                 | F 12μM R 30μM     | F 0,32μM R 0,82μM               | 0,22         |

-Augmentation de MgCl<sub>2</sub> pour les régions riche en AT ; pas de très bon résultats pour élodie, les résultats sont mieux en MgCl<sub>2</sub> 2.5mM

| <i>mix 96 MgCl<sub>2</sub> 3.8mM</i> | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i>                 | <i>1 ech</i> |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>ADN 10ng/μl</b>                   | 10ng/μl           | 20ng                            | 2            |
| <b>mix 2x</b>                        | 2x                | 0,5x ; 1,25mM MgCl <sub>2</sub> | 2            |
| <b>eau</b>                           |                   |                                 | 2.4          |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>              | 25mM              | 3.75 mM                         | 1.6          |
| <b>amorces</b>                       | F 12μM R 30μM     | F 0,16μM R 0,41μM               | 0,11         |

-Recycling : relancer jusqu'à 3 x votre plaque PCR avec 7 cycles supplémentaires, cela a permis à lui de séparer mieux ses nuages de points (relire la plaque après chaque recycling)

Kaspar\_recycling

|      |          |          |
|------|----------|----------|
| 94°C | 2 min    |          |
| 94°C | 20s      |          |
| 55°C | 60s      | 7 cycles |
| 15°C | for ever |          |

-Utiliser du PVP (pour les ADN trop riches en polysaccharides). Pour le moment cela n'a pas entraîné de différence (à retenter)

| <i>mix 96 avec vol dilués</i> | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i>                 | <i>1 ech</i> |
|-------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------------|
| <b>ADN 5ng/μl</b>             |                   |                                 | 2            |
| <b>mix 2x</b>                 | 2x                | 0,5x ; 1,25mM MgCl <sub>2</sub> | 2            |
| <b>eau</b>                    |                   |                                 | 4            |
| <b>amorces</b>                | F 12μM R 30μM     | F 0,16μM R 0,41μM               | 0,11         |
| <b>PVP 18%</b>                | 18,00%            | 1,5% (3% pour les 2μl ADN)      | 0,05         |

-Mix 96 normal avec un mix kaspar à 1x final au lieu de 0.5x

| <i>mix 96</i>     | <i>[initiale]</i> | <i>[finale]</i>              | <i>1 ech</i> |
|-------------------|-------------------|------------------------------|--------------|
| <b>ADN 5ng/μl</b> |                   |                              | 4            |
| <b>mix 2x</b>     | 2x                | 1x ; 2,5mM MgCl <sub>2</sub> | 4            |
| <b>amorces</b>    | F 12μM R 30μM     | F 0,16μM R 0,41μM            | 0,11         |

## 7. Coûts de manip pour une plaque 96 complète avec un seul marqueur (2012)



La manip coûte 21 euros (si l'amorce n'est utilisée qu'une seule fois et 7 euros si l'amorce est utilisée dans sa totalité)

### frais d'équipe

| Désignation de l'article                          | Référence | Unité de vente | VOLUME            | P.U.H.T. | remarque   | prix 96      |
|---|-----------|----------------|-------------------|----------|--|--------------|
| Plaque PCR Dutscher                               | 37360     | 25             |                   | 48,32    | 1  | 1,93         |
| KASPar SNP reagent Mix "50 000 réactions" 10x25ml |           | 10x25ml        | 250ml             | 5636     | 2µl de reaction/puits  | 4,51         |
| Amorces desing maison                             |           |                | env 600µl à 100µM | 12,5     | 5e les amorces avec extentions m13 et 2,5euro amorce normale; 0,11µl par puits à 30µM pour R | 0,07         |
| <b>total si utilisation optimale amorce</b>       |           |                |                   |          |  | <b>6,51</b>  |
| <b>utilisation optimale amorce + 10%</b>          |           |                |                   |          |  | <b>7,16</b>  |
| <b>utilisation unique amorce</b>                  |           |                |                   |          |  | <b>19,01</b> |
| <b>utilisation unique amorce + 10%</b>            |           |                |                   |          |  | <b>20,91</b> |

### estimation du consommable commun LBM

| Désignation de l'article                             | Référence  | Unité de vente | VOLUME | P.U.H.T.          | remarque     | prix 96     |
|--|------------|----------------|--------|-------------------|--------------|-------------|
| adhésif qPCR (clear seal diamond) AB812 Dutscher     | 16427F     | 100            |        | 43,05             | 1            | 0,43        |
| cones pour pipettes 10µl Starlab                     | S1111-3700 |                | 10*96  | 22,5              | 1x96         | 2,25        |
| gants latex S Dutscher                               | 50406      | 100            |        | 4,95              | 2 paires     | 0,20        |
| tubes eppendorph 1,5ml                               | 33290      | 1000           |        | 34,47             | 2            | 0,07        |
| cones pour pipettes divers (10µl 200µl 300µl 1000µl) |            |                |        | env 17e les 10x96 | 20 cones env | 0,35        |
| <b>total</b>   |            |                |        |                   |              | <b>3,30</b> |
| <b>total + 10%</b>                                   |            |                |        |                   |              | <b>3,63</b> |