

AGROVITIFREE : Lutte biologique contre la galle du collet chez la vigne

Résumé du projet pour publication officielle

La galle du collet, maladie de la vigne causée par *Agrobacterium vitis*, entraîne une diminution de rendement de l'ordre de 20 à 40% et, dans le pire des cas, la mort de la plante. Dans la nature, diverses contraintes biotiques et abiotiques (froid) influencent le processus d'infection médié par *A. vitis*. *A. vitis* est présente dans tout le vignoble et y reste à l'état latent jusqu'à ce qu'elle trouve des conditions favorables à son développement, notamment les suites de fortes gelées d'hiver ou de grêle provoquant lésions ou éclatements. Il se forme alors des tumeurs qui détruisent le système vasculaire et, sur les jeunes vignes, entraînent la mort de la souche. L'agent pathogène étant systémique, il n'existe aucun moyen de lutte chimique efficace à ce jour. Une souche bactérienne *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN capable (i) de protéger la vigne contre de nombreux stress biotiques et abiotiques mais également (ii) de favoriser la croissance de la vigne (racines et parties aériennes) après inoculation *via* le système racinaire est étudiée depuis de nombreuses années au laboratoire RIBP. PsJN a la même niche écologique (vaisseaux de xylème) qu'*A. vitis* et protège la vigne contre le gel, principale cause de propagation d'*A. vitis*. Nous avons montré que la souche PsJN induit une réduction significative de la taille des tumeurs, faisant d'elle un candidat prometteur pour lutter contre cette maladie. **L'objectif du projet est d'optimiser l'utilisation de la souche bactérienne PsJN ou de biomolécules élicitrices synthétisées par cette dernière, comme nouveau moyen de biocontrôle pour lutter contre la galle du collet chez la vigne.**

Calendrier du projet

Du 01/10/2018 au 30/09/2021

La thèse sera composée de deux tâches principales :

- Tâche 1 : Analyse des profils de colonisation bactérienne et caractérisation de la protection induite par PsJN

L'objectif de cette tâche sera de caractériser les profils de colonisation bactérienne (bénéfique et pathogène) et de déterminer le niveau de protection contre *A. vitis* induit par PsJN. Des plants de *Vitis vinifera* cv. Chardonnay (clone 7535), cultivar sensible à la galle du collet et constituant un des trois principaux cépages du champagne seront utilisés.

Cette tâche sera effectuée au cours des 18 premiers mois de la thèse. Le profil de colonisation de la bactérie bénéfique (PsJN) et pathogène (*A. vitis* S4) sera étudié par dénombrement (microbiologie) et également par observations microscopiques. En parallèle, une mise au point de la détection des souches bactériennes *in planta* sera réalisée par RT-qPCR.

- Tâche 2 : Etude de l'impact de PsJN sur l'interaction vigne/*A.vitis*

Les résultats obtenus dans le cadre de cette tâche nous permettront d'identifier les principales perturbations physiologiques et métaboliques induites par la galle du collet chez la vigne. Ainsi nous pourrions déterminer les biomarqueurs de la tumeur. Nous devrions également identifier les effets de la bactérisation (PsJN) sur le métabolome de la plante, et notamment identifier des métabolites marqueurs de résistance. L'ensemble de ces travaux donnera accès au dialogue croisé entre la plante et les bactéries au cours du processus de tumorigénèse.




Cette seconde tâche s'étendra des mois 12 à 32. Un suivi par RT-qPCR de l'expression de gènes de défense et photosynthèse sera réalisé. De même, l'évolution de l'appareil photosynthétique (teneur pigments, activité PSI et PSII, échanges gazeux) sera évalué en fonction des différents traitements. Il est en outre prévu d'identifier et de localiser des métabolites marqueurs par imagerie par spectrométrie de masse et métabolomique

A l'issue des 6 premiers mois de la thèse, un comité de pilotage réunissant des scientifiques extérieurs à l'URCA sera organisé, ainsi que durant la seconde (mois 18) année et troisième (mois 30) année.


A l'issue de la première ainsi que de la seconde année, un rapport annuel de l'état d'avancement du projet sera rédigé par l'étudiant et envoyé à l'école doctorale.


La rédaction d'articles et présentations des résultats en congrès scientifiques sera effectué en fonction de l'avancement des travaux.

Enfin, les 6 derniers mois (30 à 36) seront consacrés, au-delà de l'achèvement des expériences, à la rédaction du manuscrit de thèse ainsi que des publications.

	Année 1		Année 2		Année 3	
Tâches	6	12	6	12	6	12
Tâche 1:						
Analyses de colonisation par dénombrement (microbiologie) et observations microscopiques	x	x				
Détection des souches bactériennes <i>in planta</i> par RT-qPCR	x	x	x			
Tâche 2						
Suivi par RT-qPCR de l'expression de gènes de défense et photosynthèse		x	x	x		
Suivi des paramètres photosynthétiques (teneur pigments, activité PSI et PSII, échanges gazeux)		x	x	x		
Identification et localisation de métabolites marqueurs par imagerie par spectrométrie de masse et métabolomique				x	x	x
Etat d'avancement du projet et rédaction de rapports	Ω		Ω	 - @	Ω - @	 - @

Ω Réunion du comité de pilotage

 Rapport annuel de l'état d'avancement du projet

 Rédaction de thèse

@ Rédaction d'articles et présentations des résultats en congrès scientifiques en fonction de l'avancement des travaux

(x) Réalisation en fonction de l'avancement de la tâche

Description détaillée du projet

Contexte, présentation générale du projet

Contexte

La vigne, comme toutes les plantes, est soumise à l'attaque de nombreux agents pathogènes entraînant des pertes de récoltes autant quantitatives que qualitatives (Pezet *et al.*, 2004) avec des pertes de rendement pouvant atteindre 40% (Popp *et al.*, 2013). La maîtrise de ces parasites n'est accomplie qu'au prix d'interventions phytosanitaires fréquentes. Celles-ci présentent des effets néfastes sur l'environnement, ainsi que sur la santé des utilisateurs, et favorisent le développement de souches résistantes. La prise de conscience du coût environnemental de ces pratiques et les craintes des consommateurs du danger que peuvent constituer les résidus de pesticides pour la santé humaine font naître un intérêt grandissant pour d'autres alternatives de lutte.

La **galle du collet**, causée par *Agrobacterium vitis* (récemment reclassifié *Allorhizobium vitis* (Mousavi *et al.*, 2014), est l'une des maladies bactériennes les plus importantes de la vigne dans le monde (Burr *et al.*, 1997), entraînant une diminution de rendement et, dans le pire des cas, la mort de la plante. Dans la nature, les **contraintes biotiques et abiotiques** (notamment le froid) influencent le processus d'infection médié par *A. vitis* et, par conséquent, la **dissémination de la maladie** (Faist *et al.*, 2016).

Malheureusement, à ce jour, aucun moyen de lutte chimique efficace n'est disponible puisque l'agent pathogène est systémique. En effet, la bactérie pathogène est détectée dans la sève du xylème, de sorte que le matériel de propagation des pépinières de vigne pourrait constituer un risque supplémentaire pour la propagation d'*A. vitis* (Faist *et al.*, 2016). Sans détection précoce des agents pathogènes, les plantes infectées ne peuvent être identifiées à temps. *A. vitis* est présente dans tout le vignoble et y reste à l'état latent jusqu'à ce qu'elle trouve des conditions favorables à son développement, notamment les suites de fortes gelées d'hiver ou de grêle provoquant lésions ou éclatements. Il se forme alors des tumeurs qui détruisent le système vasculaire et, sur les jeunes vignes, entraînent la mort de la souche. Dans le cadre du changement climatique, de plus fortes gelées sont prévues (Petoukov, 2010), qui pourraient concourir à l'émergence de cette maladie. Si certaines études ont été menées sur *A. vitis* (Staphorst *et al.*, 1985 ; Wang *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2007 ; Kawaguchi, 2014), aucun agent de lutte biologique n'est à ce jour disponible sur le marché.

Une alternative à l'utilisation des pesticides consiste en l'utilisation de microorganismes bénéfiques. Parmi ces microorganismes, des bactéries de la rhizosphère dites PGPR (**Plant Growth Promoting Rhizobacteria**) suscitent un intérêt croissant (Lugtenberg & Kamilova, 2009). En effet, elles induisent non seulement une **stimulation de la croissance des plantes** mais peuvent également **protéger vis-à-vis d'agents pathogènes** (Beneduzi *et al.*, 2012). Certaines de ces bactéries sont épiphytes, c'est-à-dire qu'elles colonisent les surfaces racinaires. D'autres sont **endophytes**, elles sont capables de pénétrer à l'intérieur d'une plante et d'y survivre sans provoquer de symptômes apparents à leur hôte végétal (Hardoim *et al.*, 2008). Grâce à leur relation étroite avec leur hôte et leurs effets bénéfiques sur ce dernier, elles présentent un **intérêt particulier en biocontrôle** (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011).

Nous disposons au laboratoire d'une souche bactérienne, *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN (PsJN), capable de coloniser la rhizosphère et les tissus internes d'une grande variété de plantes (Mitter *et al.*, 2013). Cette bactérie bénéfique présente un **profil de colonisation original chez la vigne**, puisqu'elle est capable, après pénétration de la racine, de diffuser de manière **systémique** *via* les vaisseaux de xylème jusqu'aux parties aériennes (Compant *et al.*, 2005). De plus, nous avons

montré que la présence endophytique de PsJN améliore la **tolérance** des plantes **aux stress biotiques** (ex. *Botrytis*) (Ait Barka *et al.*, 2000 ; Aït Barka *et al.*, 2002 ; Miotto-Vilanova *et al.*, 2016) **ou abiotiques** (ex. stress froid) (Fernandez *et al.*, 2012 ; Theocharis *et al.*, 2012).

P. phytofirmans PsJN a la particularité d'occuper la **même niche écologique** (vaisseaux de xylème) **qu'*A. vitis***, responsable de la galle du collet et de protéger la vigne contre le gel, principale cause de propagation d'*A. vitis*. Ces caractéristiques nous ont amenés à tester la souche bénéfique PsJN comme agent de biocontrôle potentiel contre *A. vitis*. Des études réalisées au laboratoire RIBP sur des vitroplants de vigne bactérisés avec la souche PsJN et infectés par l'agent de la galle du collet ont montré que **la bactérie bénéfique PsJN induit une protection contre *A. vitis* avec une diminution des effets de ce pathogène**, notamment la formation de tumeurs.

Objectifs recherchés

A travers ce projet nous souhaitons :

- (i) déterminer précisément les profils de colonisation d'*A. vitis* en présence ou non de *P. phytofirmans* ;
- (ii) déterminer si la protection induite par la bactérie bénéfique se fait *via* une compétition entre PsJN et *A. vitis* pour la même niche écologique (xylème) au profit de la bactérie bénéfique ou si la protection est corrélée à la mise en place de mécanismes de défense de la plante ;
- (iii) identifier des métabolites marqueurs de résistance.

L'objectif finalisé de ce projet est de développer un nouveau moyen de biocontrôle pour lutter contre la galle du collet chez la vigne, *via* l'utilisation d'une souche bactérienne PsJN, occupant la même niche écologique que l'agent pathogène.

Principales actions présentées

Le projet fait appel à des approches pluridisciplinaires (physiologiques, moléculaires et métaboliques) complémentaires et se décompose en 2 tâches principales.

Tâche 1 : Profils de colonisation bactérienne et caractérisation de la protection induite par PsJN

L'objectif de cette tâche sera de **caractériser les profils de colonisation bactérienne (bénéfique et pathogène)** et de **déterminer le niveau de protection contre *A. vitis* induit par PsJN**. Des plants de *Vitis vinifera* cv. Chardonnay (clone 7535), cultivar sensible à la galle du collet et constituant un des trois principaux cépages du champagne, seront utilisés. Le pathosystème vigne/*A. vitis* a été mis au point au laboratoire RIBP en collaboration avec le laboratoire d'Ecologie microbienne UMR CNRS 5557 - LEM (Université Claude Bernard Lyon) qui nous a fourni la souche S4 d'*A. vitis*. Un protocole de bactérisation par PsJN et infection par *A. vitis* a été testé et validé sur tiges de vitroplants. En nous basant sur les connaissances et la méthodologie développée au laboratoire RIBP pour déterminer le profil de colonisation de la vigne par *P. phytofirmans* PsJN (Ait Barka *et al.*, 2000 ; Aït Barka *et al.*, 2002 ; Miotto-Vilanova *et al.*, 2016), nous déterminerons, par **microscopie électronique à transmission et microscopie à fluorescence et confocale**, le profil de colonisation de l'agent pathogène *A. vitis* S4 (souche de référence) en présence ou non de PsJN. Afin de compléter cette étude, nous évaluerons les changements structuraux et ultra-structuraux induits par l'agent pathogène et/ou l'agent bénéfique par microscopies optique et électronique. La **protection** induite par *P. phytofirmans* **à l'encontre d'*A. vitis*** sera évaluée au niveau

de la tige de manière qualitative, par observations visuelles et observations microscopiques 3D. En complément de la détection microscopique, une **quantification** (à différents temps après infection) *in planta* d'*A. vitis* en présence ou non de PsJN sera réalisée **par dénombrement et par PCR quantitative en temps réel** (qRT-PCR) afin de quantifier la protection induite par la bactérie bénéfique PsJN.

Tâche 2 : Impact de PsJN sur l'interaction Vigne-*A. vitis*

2a) Mécanismes de défense et photosynthèse

La **potentialisation** est un état physiologique qui permet à la plante d'induire plus vite et/ou plus intensément ses mécanismes de défense lorsqu'elle est soumise à un stress ultérieur (Martinez-Medina *et al.*, 2016). Dans l'interaction Vigne/PsJN/*A. vitis*, les mécanismes de défense précoces seront étudiés : la **production** de formes actives de l'oxygène (**FAO**), ainsi que le dépôt de **callose** seront mesurés. Pour les événements plus tardifs, l'**expression de gènes de défense** (liés aux voies de signalisation de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène) sera évaluée.

Les mécanismes de défenses étant consommateurs d'énergie et donc impactant potentiellement le rendement, nous étudierons également leur influence sur le **métabolisme carboné**, source principale d'énergie pour la plante. L'expression de gènes de défense/photosynthèse sera étudiée par qRT-PCR. Les paramètres photosynthétiques sont souvent modifiés suite à l'inoculation de microorganismes, notamment la teneur en pigments, l'activité du PSII et les échanges gazeux. Nous proposons donc de **mesurer l'impact de la colonisation bactérienne (*A. vitis* +/- PsJN) sur la photosynthèse**.

2b) Métabolites de la plante et localisation spatio-temporelle

Les vitroplants contrôle ou colonisés par PsJN et infectés ou non par *A. vitis* seront soumis à une **approche métabolomique** et à l'**imagerie par spectrométrie de masse** afin de (i) confirmer la co-localisation (Ye *et al.*, 2013) de *A. vitis* et PsJN au niveau du xylème ; (ii) déterminer les effets dans la distribution et l'abondance des métabolites (Stoeckli *et al.*, 2007) produits par les deux bactéries (bénéfique et pathogène) et la vigne dans l'interaction tripartite et (iii) vérifier si l'interaction tripartite produit de nouveaux métabolites qui pourraient servir à évaluer l'activité de PsJN en tant qu'agent de biocontrôle. Les métabolites seront identifiés par MS/MS *in situ* (Quanico *et al.*, 2017a, b, c) et comparés aux métabolites totaux extraits par LC-MS/MS (Wisztorski *et al.*, 2017). Les tumeurs seront également analysées en utilisant le SpiderMass, un outil développé spécifiquement par le laboratoire PRISM et qui permet une analyse des métabolites en temps réel *in vivo* (Fatou *et al.*, 2016). La préparation des échantillons étant une étape primordiale pour les études métabolomiques, nous avons, avec le laboratoire PRISM (Université Lille), testé et validé un protocole de préparation d'échantillons de tiges de vitroplants infectés par *A. vitis*. Les résultats obtenus dans le cadre de cette tâche nous permettront d'identifier les principales perturbations physiologiques et métaboliques induites par la galle du collet chez la vigne.

Résultats escomptés (cible visée...)

Au plan fondamental, le projet proposé devrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance induite par PsJN contre la galle du collet chez la vigne. La meilleure compréhension de ces mécanismes demeure une étape incontournable pour **envisager une certaine maîtrise des maladies** pour cette espèce par biocontrôle. L'étude métabolomique permettra non seulement d'identifier les principales perturbations engendrées par *A. vitis* et les

marqueurs de résistance modulés par PsJN mais aussi d'établir une corrélation avec la mise en place des défenses. Nous espérons à l'issue de ce projet avoir identifié des marqueurs métaboliques affectés chez la vigne lors de l'infection par *A. vitis*, ainsi que des marqueurs spécifiquement induits en présence de l'agent de biocontrôle (PsJN).

Compte tenu de l'expertise reconnue du laboratoire RIBP (URCA) et du laboratoire PRISM (Université de Lille) et des résultats préliminaires obtenus par les deux partenaires de ce projet faisant office de preuve de concept, le travail de thèse a toutes les chances d'aboutir à une production scientifique d'excellent niveau *via* la publication d'articles de rang A et la participation à des congrès nationaux et internationaux.

Au plan appliqué, il est nécessaire, dans un premier temps, de développer des outils permettant protéger la plante contre cette maladie et de caractériser l'induction des mécanismes de défense de la plante. Nous considérerons que ce volet du programme est réussi si nous mettons au point des **marqueurs de résistance** (métabolomiques) fiables et rapides à mettre en œuvre.