

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

**MISE AU POINT D'OUTILS DE DIAGNOSTIC POUR L'ÉVALUATION DE L'ÉLICATION DES
MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES SUITE A L'APPLICATION DE SDP**

C. VERLY^(1, 2), M.E. SAINT-MACARY⁽³⁾, G. CUEFF⁽⁴⁾, M. RIGAULT⁽⁴⁾, F. GIRAUD⁽²⁾,
L. RAJJOU⁽⁴⁾ et A. DELLAGI⁽⁴⁾

- (1) INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), UMR 1318 INRA-AgroParisTech, ERL CNRS 3559 - Université Paris-Saclay, Laboratoire d'Excellence "Sciences des Plantes de Saclay" (LabEx SPS), RD10, F-78026 Versailles, France
- (2) Staphyt, Site de Montesquieu, Av François Magendie, 33650 Martillac, France
- (3) Staphyt, La Paluzette, Route des Mas 34590 Marsillargues, France
- (4) AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), UMR 1318 INRA-AgroParisTech, ERL CNRS 3559 - Université Paris-Saclay, Laboratoire d'Excellence "Sciences des Plantes de Saclay" (LabEx SPS), RD10, F-78026 Versailles, France

Contacts : camille.verly@versailles.inra.fr ; mesaintmacary@staphyt.com
fgiraud@staphyt.com ; loic.rajjou@agroparistech.fr ; alia.dellagi@agroparistech.fr

RÉSUMÉ

Le développement de molécules capables de stimuler les défenses naturelles des plantes (SDP) est une stratégie en plein essor qui se heurte néanmoins à une efficacité variable sur le terrain. Or, il n'existe pas d'outils de diagnostic pour vérifier leur capacité à activer des mécanismes de résistance des plantes au champ. Staphyt en collaboration avec le Labex Saclay Plant Sciences, développe actuellement un test laboratoire ainsi qu'un test immunologique simple permettant la détection de l'activation des mécanismes de défense sur plusieurs espèces végétales. Un anticorps spécifique d'une protéine marqueur a déjà été obtenu et validé sur une plante modèle en laboratoire. L'état d'avancement des travaux sur ces deux tests seront présentés.

Mots-clés : Plantes, SDP, défenses, pathogène, immunotest.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC TOOL FOR EVALUATION OF PLANT DEFENSE MECHANISMS ELICITATION BY NDS

The development of molecules able to stimulate the natural defenses of plants (NDS) is a booming strategy. However, the effectiveness of the NDS remains variable and there are no efficient diagnostic tools to assess their defense activation capacity in the field. Staphyt is developing, in collaboration with Saclay Plant Sciences, a laboratory test and a simple immunoassay for the detection of plant defense activation in several plant species. An antibody was raised against a marker protein and was validated on a model plant. Workprogress on both tests will be presented.

Keywords: Plants, NDS, defenses, plant pathogen, immunoassay.

INTRODUCTION

La réduction de l'usage des produits phytosanitaires conventionnels, prévue dans le plan national Ecophyto et incluse dans le projet agro-écologique pour la France, se traduit par le développement de nouvelles stratégies pour des pratiques agricoles plus durables et plus respectueuses de l'environnement. Le développement de molécules ou de formulations capables de stimuler les défenses naturelles des plantes (SDP) pour les protéger contre les bioagresseurs est une stratégie prometteuse qui suscite de plus en plus d'intérêt en agriculture. En effet, la stimulation des défenses naturelles des plantes peut constituer une option pour aller vers la réduction de l'utilisation de produits phytopharmaceutiques « conventionnels ».

Les plantes possèdent un système immunitaire inné qui leur permet de se défendre contre les bioagresseurs. La perception du bioagresseur (ou de l'éliciteur) fait intervenir de nombreux processus physiologiques qui impliquent deux voies de défense systémiques, la SAR (Systemic Acquire Resistance) et l'ISR (Induce Systemic Resistance) (Vallad et Goodman, 2004). La SAR est principalement mise en place suite à une attaque par un agent pathogène et fait intervenir l'acide salicylique (SA). L'ISR est généralement induite par des rhizobactéries non pathogènes et fait intervenir l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) (Pieterse et van Loon, 1999 ; Jourdan *et al*, 2008).

L'utilisation de SDP repose sur l'activation des différentes voies de défense de la plante et ainsi limitent l'infection par les agents pathogènes. L'utilisation de produits phytosanitaires « conventionnels » peut ainsi être réduite (Aziz *et al*, 2003 ; Benhamou et Rey, 2012). Dans certains cas les SDP n'activent pas directement les défenses, mais créent un état d'alerte de la plante lui permettant de répondre plus rapidement suite à un stress biotique. Ce phénomène est appelé « potentialisation » ou « priming » (Conrath *et al*, 2006).

L'identification de molécules SDP efficaces requiert des outils de criblage fiables, efficaces et utilisables en routine. La mise au point de méthodes robustes de détection de l'activation des mécanismes de défense des plantes est un enjeu majeur pour la bonne évaluation de ce type de produits autant en laboratoire que sur le terrain. L'outil terrain s'avère indispensable notamment pour tester la réceptivité des plantes aux sites d'expérimentations retenus afin de s'assurer de la pertinence de l'efficacité observée des produits au cours du temps.

Staphyt, leader en expérimentation sur les végétaux, en collaboration avec l'Institut Jean-Pierre Bourgin (UMR 1318 INRA-AgroParisTech) développe deux méthodes robustes et économiques de détection de l'activation des mécanismes de défense des plantes. D'une part, un test laboratoire, qui permet de déterminer l'effet (activation ou potentialisation) d'un SDP potentiel ainsi que la voie de défense concernée (SAR ou ISR). D'autre part, un test immunologique terrain permettant de détecter l'état d'activation des défenses des plantes en plein champ. Ce dernier test est basé sur la reconnaissance d'une protéine et non sur l'expression de gènes, afin de s'affranchir d'éventuelles variations dues aux régulations post-transcriptionnelles des ARNm.

Ce projet a été initié depuis un an, dans le cadre du programme d'aide au partenariat SPS'innov (Projet Elicitest 2014-2015) et soutenue financièrement par le Laboratoire d'Excellence des Sciences des Plantes de Saclay (LabEx SPS).

Dans cette présentation nous décrirons les approches expérimentales mises en place pour atteindre les objectifs décrits ci-dessus.

Le kit de diagnostic développé fera l'objet d'une protection intellectuelle (*e.g.* brevet) par STAPHYT / INRA-IJPB. Des licences d'évaluation et/ou d'exploitation seront envisagées par STAPHYT / INRA-Transfert.

MATERIEL ET MÉTHODE

TEST LABORATOIRE

Principe du test :

Afin de mettre en évidence l'activation de la voie SA ou JA, des plantes exprimant un gène rapporteur qui s'active en réponse à chacune des deux hormones sont utilisées. Il s'agit de plantes transgéniques possédant le gène rapporteur de la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur du gène *PR1* (Pathogenesis-related 1) ou du gène *PDF1.2* (Plant defensin). L'enzyme GUS est capable de cliver le substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid, cyclohexylammonium) et produit un précipité bleu et insoluble. Pour mettre en évidence l'activation de l'enzyme GUS, les plantes sont incubées dans le X-Gluc. Si une coloration bleue apparaît, cela indique que l'enzyme GUS a été activée et que la voie de défense considérée a été activée.

Tableau I : Plantes utilisées pour révéler l'activation de la SAR ou de l'ISR
(Plants used as indicators of SAR or ISR activation)

Construction exprimée par la plante	Type de réponse détectée
<i>PR1 ::GUS</i>	SAR par la voie de l'acide salicylique (Kariola <i>et al</i> , 2003).
<i>PDF1.2 ::GUS</i>	ISR par les voie de l'acide jasmonique ou éthylène (Manners <i>et al</i> , 1998).

Mise en place du test :

Afin de valider l'éllicitation ou la potentialisation engendrée par les SDP, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* (exprimant les fusions GUS décrites ci-dessus) sont cultivées *in-vitro* durant 4 semaines puis pulvérisées avec différents éliciteurs. Les produits utilisés comme contrôles positifs de l'activation de 2 voies systémiques sont l'acide salicylique (SA à 1 mM) pour la SAR et le Methyl-jasmonate (Me-JA à 0.1 mM) pour l'ISR. Deux éliciteurs commerciaux ainsi qu'un potentialisateur, dont les modes d'action sont plus ou moins élucidés sont également utilisés : le Bion® (0,015%) comme éliciteur de la SAR et le Stifenia® (1%) comme éliciteur de l'ISR. Afin de mimer l'arrivée d'un pathogène de type bactérien ou fongique, les plantes sont respectivement pulvérisées avec de la flagelline (100 nM) ou du chitosan (1 %), 48h après le traitement SDP. Dans notre test, l'eau est utilisée comme témoin négatif, le SA ou Me-JA comme témoins positifs.

La deuxième pulvérisation avec de la flagelline ou du chitosan permet de visualiser l'effet potentialisateur de ces voies de défense par ces mêmes SDP.

TEST IMMUNOLOGIQUE TERRAIN

Principe du test :

Une protéine «marqueur», impliquée dans les principales voies de défense systémique des plantes (SAR et ISR) a été ciblée. Des séquences peptidiques, conservées dans plusieurs plantes, ont été identifiées. La mise au point du test immunologique (type ELISA) est basée sur des anticorps spécifiques de cette protéine.

Mise en place du test :

Des peptides dégénérés consensus basés sur les séquences peptidiques identifiées ont été synthétisés puis injectés dans des lapins pour produire des anticorps par l'entreprise Genepep (<http://www.genepep.com>). Les anticorps ont été purifiés et testés sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Un des anticorps, capable de reconnaître spécifiquement l'activation des défenses chez cette plante modèle, a d'ores et déjà été validé en Western Blot. Les séquences, correspondant au

peptide utilisé, de différentes plantes cultivées ont fait l'objet d'une analyse bio-informatique (alignement de séquences) à l'aide du logiciel Jalview. Différentes classes de végétaux sont ainsi distinguées (Tableau II). L'anticorps produit est alors utilisé en western blot pour détecter la protéine d'intérêt chez un représentant de cinq de ces classes (classe 1 : arabidopsis, classe 2 : brachypodium, classe 3 : luzerne, classe 4 : tomate et classe 5 : vigne). Chacune de ces plantes est traitée de manière à activer les défenses soit avec des hormones (SA à 1mM pour la SAR et Me-JA à 0.1mM pour l'ISR), soit avec un SDP (Bion® à 0.015%), soit avec de l'eau (témoin négatif). Les extractions de protéines sont réalisées 24h après le traitement.

Tableau II : Différentes classes de végétaux en fonction de leur séquence
(Various classes of plants according to their sequence)

Classe	Plante
1	<u>arabidopsis</u> – betterave
2	riz – <u>brachypodium</u> – blé dur – maïs – bananier
3	<u>luzerne</u> – coton – cacao
4	<u>tomate</u> – pomme de terre – ricin – piment – peuplier – tabac – patate douce – papaye
5	<u>vigne</u>

Des westerns blots sont réalisés sur les protéines totales extraites de ces plantes. L'extraction est réalisée au froid à raison de 1µl de tampon (Tris-HCl, NaCl, MgCl₂, EDTA, Glycérol, Iodoacétamide, IP) par mg de plante. Les extraits sont alors centrifugés 10 min à 14000 g. Les surnageants sont récupérés puis mélangés au tampon Laemmli (SDS, β mercaptoéthanol et bleu de Bromophénol), chauffés 10 min à 60°C puis déposés sur un gel SDS-PAGE (10% d'acrylamide) et transférés sur membrane de PVDF après électrophorèse. Les membranes sont alors incubées avec l'anticorps (au 1/500) dans un tampon phosphate avec du lait (5%), puis avec un anticorps secondaire anti-lapin (au 1/5000) couplé à la peroxydase (Santa-Cruz Biotechnology). La révélation est faite à l'aide du kit de révélation ECL Select détection Western Blotting reagent (GE Healthcare). Les résultats sont alors visualisés grâce à un analyseur d'image par luminescence LAS4000 (Fujifilm).

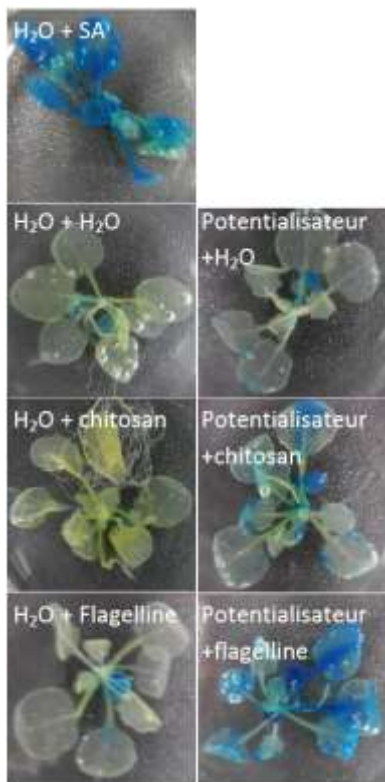
RESULTATS

TEST LABORATOIRE

Seuls les résultats du test de potentialisation de la SAR par un SDP sont présentés ici (Figure 1). Les résultats du test de potentialisation de l'ISR seront présentés ultérieurement.

Les plantes pulvérisées une première fois avec de l'eau puis avec du SA sont fortement colorées en bleu (témoin positif de l'activation de la SAR). Les plantes pulvérisées deux fois avec de l'eau, ou avec un potentialisateur puis de l'eau, ainsi que avec de l'eau puis du chitosan ou de la flagelline ne présentent pas de coloration bleue. Ces conditions ne permettent donc pas l'activation de la SAR. Par contre les plantes pulvérisées une première fois avec le potentialisateur puis une deuxième fois avec du chitosan ou de la flagelline sont colorées en bleu (Figure 1). Cette coloration est plus faible avec le chitosan qu'avec la flagelline. Ces conditions permettent donc l'activation de la SAR. Le potentialisateur permet donc d'obtenir une réponse rapide au chitosan ou à la flagelline (mimants un pathogène) et a donc bien un effet potentialisateur de la SAR.

Figure 1 : Visualisation *in situ* de l'expression du gène *PR1* à l'aide de la construction *PR1-GUS* d'*A. thaliana*
(*In situ* visualization of PR1 gene expression using *PR1-GUS* construct in *A. thaliana*)

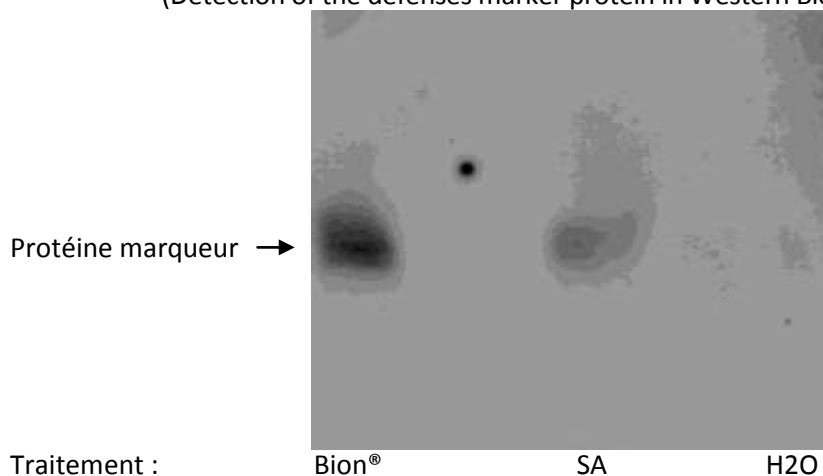


TEST IMMUNOLOGIQUE TERRAIN

Seuls les résultats de validation de l'anticorps obtenus sur *A. thaliana* sont présentés ici (Figure 2). Les analyses sur les autres plantes sont en cours de réalisation et les résultats seront présentés ultérieurement.

Les plantes sont traitées avec du SA ou du Bion. Les protéines sont extraites 24h après traitement et utilisées pour réaliser un western blot. Une bande est obtenue avec le traitement SA et Bion alors qu'il n'y a aucune bande dans les échantillons témoin.

Figure 2 : Détection de la protéine marqueur des défenses en Western blot
(Detection of the defenses marker protein in Western Blot)



L'anticorps produit permet de détecter la protéine marqueur des voies de défenses sur les plantes d'*A. thaliana* traitées avec du Bion ou du SA mais pas lorsque les plantes sont traitées avec de l'eau (témoin négatif).

DISCUSSION

Nous avons mis au point une approche expérimentale, qui permet de détecter l'activation des mécanismes de défense sur *A. thaliana*. Lors du cinquième séminaire AFPP de Lille, nous avons déjà montré que l'application de SA ou de Bion® engendrait l'expression du gène *PR1* dans le test de laboratoire avec des plantes exprimant la fusion *PR1 ::GUS*, validant l'activation de la SAR. La même stratégie a été développée pour la voie de l'ISR et est actuellement en cours de validation.

Ce test peut aussi être utilisé pour démontrer un effet de potentialisation des défenses en effectuant un premier traitement avec un potentialisateur, puis un deuxième avec une molécule mimant un pathogène bactérien (flagelline) ou fongique (chitosan)

Ce approche simple et peu coûteuse doit permettre de déterminer l'effet (activation ou potentialisation) d'un SDP potentiel ainsi que la voie de défense concernée (SAR ou ISR).

L'anticorps produit contre un des peptides dégénérés consensus d'une protéine de défense, permet bien de détecter l'activation des voies de défense chez *A. thaliana*. Afin de savoir s'il est utilisable dans le cadre du test terrain envisagé, des westerns blots sont en cours de validation sur d'autres plantes représentatives de la plupart des plantes cultivées. Les résultats sont en cours d'obtention et seront présentés lors de la CIMA.

CONCLUSION

Le test laboratoire (*A. thaliana*) développé est un test intéressant car c'est un test simple et peu coûteux qui permet de valider l'effet éliciteur ou potentialisateur d'une préparation en précisant la(les) voie(s) de défense recrutée(s). Ce test doit permettre d'appréhender le mode d'action des préparations en développement et ainsi optimiser la stratégie d'utilisation pour l'expérimentation en champ. Ce test rapide a également pour objectif de faire du screening de molécules potentiellement SDP et ainsi contribuer au développement global de la stratégie de stimulation des défenses en protection des plantes.

Concernant l'immunotest terrain, les résultats obtenus sur *A. thaliana*, sont prometteurs mais des vérifications sont en cours sur plantes cultivées en serre et d'autres seront à effectuer en conditions naturelles avant l'industrialisation du test.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le LabEx "Sciences des Plantes de Saclay" pour le financement de l'initiation du projet (ELICITEST 2014-2015) dans le cadre du programme SPS'innov 2014 ainsi que l'entreprise Staphyt pour le financement de la poursuite du projet et l'Institut Jean Pierre Bourgin (IJPB, Versailles) pour l'accueil du personnel travaillant sur ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert B., Joubert J.-M., Pugin A., 2003 - Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against botrytis cinerea and Plasmopara viticola. *MPMI*. 16, 12, 1118-1128.
- Benhamou N., Rey P., 2012 - Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. : I. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection*. 92, 1, 1-23.
- Conrath C.-U., Beckers J.-M.-G., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M.-A., Pieterse C.-M.-J., Poinssot B., Pozo M.-J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B., 2006 - Priming: Getting Ready for Battle. *MPMI*, 19, 10, 1062–1071.
- Jourdan E., Ongena M., Thonart P., 2008 - Caractéristiques moléculaire de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol Agron Soc Environ*. 12, 4, 437-449.
- Kariola T., Palomäki TA., Brader G., Palva TE., 2003 - *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* and *Erwinia*-derived Elicitors HrpN and PefA trigger distinct but interacting defense responses and cell death in *Arabidopsis*. *MPMI* 16, 3, 179-187.
- Manners J.-M., Penninckx I.-A.-M.-A., Vermaere K., Kazan K., Brown R.-L., Morgan A., Maclean D.-J., Curtis M.-D., Cammue B.-P.-A., Broekaert W.-F., 1998 - The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl-jasmonate but not to salicylic acid. *Plant. Mol. Biol.* 38, 1071–1080.
- Pieterse C.M.J., van Loon L.C., 1999 - Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trend in plant Sci.* 4, 2, 52-58.
- Vallad G.E., Goodman R.M., 2004 - Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44, 1920-1934.