

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

MISE AU POINT D'UN OUTIL DE DIAGNOSTIC TERRAIN POUR L'ÉVALUATION DE SDP

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

(1) Staphyt, La Paluzette, Route des Mas 34590 Marsillargues, France

(2) INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318, ERL CNRS 3559, Laboratoire d'Excellence "Sciences des Plantes de Saclay" (LabEx SPS), RD10, F-78026 Versailles, France

(3) AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR 1318, ERL CNRS 3559, Laboratoire d'Excellence "Sciences des Plantes de Saclay" (LabEx SPS), RD10, F-78026 Versailles, France

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

RÉSUMÉ

Dans le cadre du plan Ecophyto 2018, le développement de molécules capables de stimuler les défenses naturelles des plantes (SDP) est une stratégie en plein essor et prometteuse. Toutefois, l'évaluation de l'efficacité des SDP reste un aspect à développer. En effet, il n'existe pas d'outils de diagnostic au champ pour évaluer leur capacité d'activation de mécanismes de défense des plantes. L'objectif de ce projet est de mettre en place un test de détection des réponses immunitaires générales chez les plantes traitées. Pour cela, Staphyt, leader en expérimentation sur les végétaux, développe actuellement, en collaboration avec le Laboratoire d'Excellence des Sciences des Plantes de Saclay (LabEx SPS), un test immunologique simple et fiable permettant la détection d'un marqueur de défense sur plantes cultivées *in situ*. L'état d'avancement des travaux sur ce test sera présenté.

Mots-clés : SDP, défenses, pathogène, immunotest

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC TOOL FOR SDP EVALUATION

Considering the Ecophyto 2018 directives, the development of molecules able to stimulate the natural defenses of plants (SDP) is a booming and promising strategy. However, the effectiveness of the SDP remains uncertain and there are no efficient diagnostic tools to assess their activation capacity in the field. The objective of this project is to develop a diagnostic tool for general immune responses in plants. For this, Staphyt, leader in plant experimentation, is developing in collaboration with the Laboratory of Excellence Saclay Plant Sciences, a simple and reliable immunoassay for the detection *in situ* of a plant natural defense marker. The progress of the work on this test will be presented.

Keywords: Plantes, SDP, defenses, plant pathogen, immunoassay

INTRODUCTION

La réduction de l'usage des produits phytosanitaires conventionnels (Ecophyto 2018), se traduit par le développement de nouvelles pratiques agricoles et notamment par l'utilisation de molécules capables de stimuler les défenses naturelles des plantes (SDP). Cependant, bien qu'elles constituent une stratégie prometteuse, l'efficacité des SDP sur le terrain reste souvent insuffisante et difficile à évaluer. A ce jour, Il n'existe pas d'outil fiable de diagnostic au champ pour évaluer leur capacité d'activation de mécanismes de défense des plantes.

Plusieurs tests en conditions de cultures semi-contrôlées ont infirmé les résultats positifs de stimulation de défenses obtenus en laboratoire. Ce phénomène de discordance est encore plus marqué lorsque les essais se font en conditions naturelles de plein champ. Ainsi, de nombreux projets de produits SDP développés en laboratoire ne peuvent pas aboutir à des autorisations de mise sur le marché (AMM) faute d'efficacité avérée. L'identification et la validation de molécules SDP efficaces requièrent le développement d'outils de diagnostic «terrain» performants et utilisables en routine. Ce projet a donc pour ambition de créer un outil d'aide à la décision (OAD) à la fois pour l'expérimentation mais également, à plus long terme, pour l'utilisation des SDP dans des programmes de protection intégrée des cultures. Cet outil s'avère indispensable pour le suivi de l'efficacité des SDP sur le terrain et à l'adaptation des programmes de traitements qui en découle.

Les plantes possèdent un système immunitaire inné qui leur permet de se défendre contre les bioagresseurs. Les réponses immunitaires les plus conservées sont l'accumulation de métabolites secondaires à activité antimicrobienne (*e.g.* phytoalexines, flavonoïdes, terpenoïdes), de molécules oxydantes générant un «burst oxydatif», de protéines à activité antimicrobienne (protéines PR) et de constituants de la paroi de type callose ou lignine. Toute molécule capable d'activer les réponses immunitaires de la plante, qu'elle soit issue de bioagresseurs ou d'autres sources sont appelées des «éliciteurs » de défense. La transduction du signal depuis la perception de l'éliciteur jusqu'à l'accumulation des composés de défense fait intervenir de nombreux processus dont des flux ioniques, des cascades de phosphorylation et impliquent différentes voies hormonales telles que celle de l'acide salicylique (SA), de l'acide jasmonique (JA), ou de l'éthylène selon le type de pathogène (biotrophe ou nécrotrophe) (Jones et Dangl, 2006). Il existe ainsi, selon les hormones impliquées, deux voies de défense systémiques, la SAR (Systemic Acquire Resistance) et l'ISR (Induce Systemic Resistance). La SAR est principalement impliquée dans la réponse aux pathogènes et fait intervenir le SA. L'ISR est généralement induite par des rhizobactéries non pathogènes et implique le JA et l'éthylène (Devendra *et al*, 2007).

Ce projet repose sur la création et la mise au point d'un kit de détection de la stimulation des défenses des plantes utilisable pour des essais au champ. Ce test est basé sur la reconnaissance d'une protéine et non sur l'expression de gènes, afin de s'affranchir d'éventuelles erreurs dues aux régulations post-transcriptionnelles des ARNm. Pour cela, une protéine «marqueur», impliquée dans les principales voies de défense systémique des plantes (SAR et ISR) a été ciblée. Cette protéine existe à l'état oligomérique ou monomérique. C'est sous sa forme monomérique que cette protéine est active. La mise au point d'un test immunologique (type ELISA) nécessite des anticorps spécifiques. Afin de reconnaître uniquement la forme monomérique, les anticorps produits ne ciblent que la partie inaccessible de cette protéine sous sa forme oligomérique. L'objectif est d'obtenir un anticorps qui reconnaisse uniquement la forme active de la protéine dans plusieurs espèces végétales.

Dans cette présentation nous décrivons 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.

MATERIELS ET METHODES

PRODUCTION DE MATERIEL VEGETAL ET VERIFICATION DE L'ELICITATION DES DEFENSES PAR LES SDP

Afin de tester les anticorps produits, des plantes d'*Arabidopsis thaliana* (une quinzaine par condition) sont cultivées *in-vitro* durant 4 semaines puis pulvérisées avec différents éliciteurs ou SDP. Les produits utilisés sont le SA (1 mM) comme contrôle positif, le Bion® (0,015%) comme SDP éliciteur de la voie SA, le Stifenia® (1%) comme SDP éliciteur de la voie JA et l'eau en témoin négatif. Les plantes sont récoltées à 24h et 72h post-inoculation (hpi).

Afin de valider l'élicitation engendrée par ces molécules dans les conditions utilisées, des plantes transgéniques possédant le gène rapporteur de la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle du promoteur du gène *PR1* (Pathogenesis-related 1) sont traitées de la même manière. Ces plantes permettent de visualiser l'expression du gène *PR1* activé lors de la mise en place de la SAR (Kariola *et al*, 2003). Lorsque le substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid, cyclohexylammonium) est apporté à la plante, l'enzyme GUS va cliver ce substrat et produire un précipité bleu et insoluble. Une coloration bleue apparaît alors si le gène *PR1* est exprimé, au niveau des cellules qui l'expriment. Ceci permet de mettre en évidence l'élicitation ou non de cette voie des défenses par les différents SDP.

Cette expérience sera aussi réalisée avec une construction promoteur *PDF1*-gène *GUS* (*PDF1.2-GUS*) permettant de visualiser l'élicitation de la voie de l'acide jasmonique impliquée dans l'ISR (Kariola *et al*, 2003).

PRODUCTION D'ANTICORPS

Deux stratégies sont développées en parallèle pour la production d'anticorps à l'aide de différentes cibles d'épitopes sur la protéine d'intérêt.

La première consiste à utiliser des peptides synthétiques dont la séquence est conservée chez plusieurs espèces du règne végétal. Un alignement multiple des séquences protéiques codées par des gènes orthologues de la protéine marqueur, a été effectué, dans plusieurs espèces végétales. Il a permis d'obtenir deux séquences conservées de 12 acides aminés (Fig. 1). Des peptides sont synthétisés puis injectés dans des lapins pour produire des anticorps par l'entreprise Genepep (<http://www.genepep.com>). Cette stratégie doit permettre de produire des anticorps reconnaissant l'activation des défenses chez toutes les plantes cultivées.

La deuxième stratégie consiste à utiliser la protéine cible d'*Arabidopsis thaliana* produite de manière recombinante par la bactérie *Escherichia coli*. Cette stratégie a pour but de vérifier la faisabilité du test avec une plante modèle dont les systèmes de défense sont bien connus.

Pour cela, la protéine totale (T pour Totale), la partie d'intérêt (I pour Intérêt), ainsi qu'une partie intermédiaire (P pour Partielle) sont clonées à l'aide de la technologie Gateway™ sous le contrôle d'un promoteur inductible avec une étiquette histidine. Une séquence de clivage protéique (TEV) est ajoutée à la construction afin d'éliminer l'étiquette (tag) ainsi que la séquence Gateway™ après purification (Fig. 1). La purification des protéines est effectuée à l'aide d'une résine de Nickel (complete His-tag purification Resin de Roche®), en condition dénaturante (8 mol/L d'urée) selon le protocole du fournisseur. Le clivage est effectué à l'aide de la TEV protéase (T4455, Sigma). Ces protéines sont produites à l'IJPB.

Figure 1 : Schéma des peptides et protéines recombinantes vis à vis de la protéine cible.
 (Pattern of recombinant proteins and peptides with respect to the targeted protein).
 His : HIS-tag, Gat : séquence de recombinaison Gateway, TEV : séquence de clivage protéique.



DOT BLOTS

Les sérums obtenus à l'aide de la première stratégie (peptides de synthèse) sont testés en dot blots. Ainsi, 2 µl de BSA, 2 µl de chaque peptide (0,5 mg/ml) et 2 µl de protéine recombinante T non purifiée et purifiée et clivée sont déposés sur membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène). Les membranes sont alors incubées avec les différents sérums (1/1000) 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 detection Western Blotting reagent (GE Healthcare). Les résultats sont alors visualisés grâce à un analyseur d'image par luminescence LAS4000 (Fujifilm). Les anti-peptides sont purifiés grâce au peptide correspondant bloqué sur membrane de PVDF puis utilisés en dot blots de la même manière que les sérums.

WESTERN BLOTS

Des westerns blots sont réalisés sur les protéines totales extraites des bactéries contenant les trois constructions T, P et I de la protéine d'intérêt d'*A. thaliana* (deuxième stratégie). Les extraits sont 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 80°C puis déposés sur un gel SDS-PAGE et transférés sur membrane de PVDF après électrophorèse. Un anticorps connu pour cibler le His-tag est utilisé, dilué au 1/1000. Cet anti-corps est couplé à la peroxydase (Santa-Cruz Biotechnology). La révélation est faite à l'aide du kit de révélation ECL Select detection Western Blotting reagent (GE Healthcare). Les résultats sont alors visualisés grâce à un analyseur d'image par luminescence LAS4000 (Fujifilm).

RESULTATS

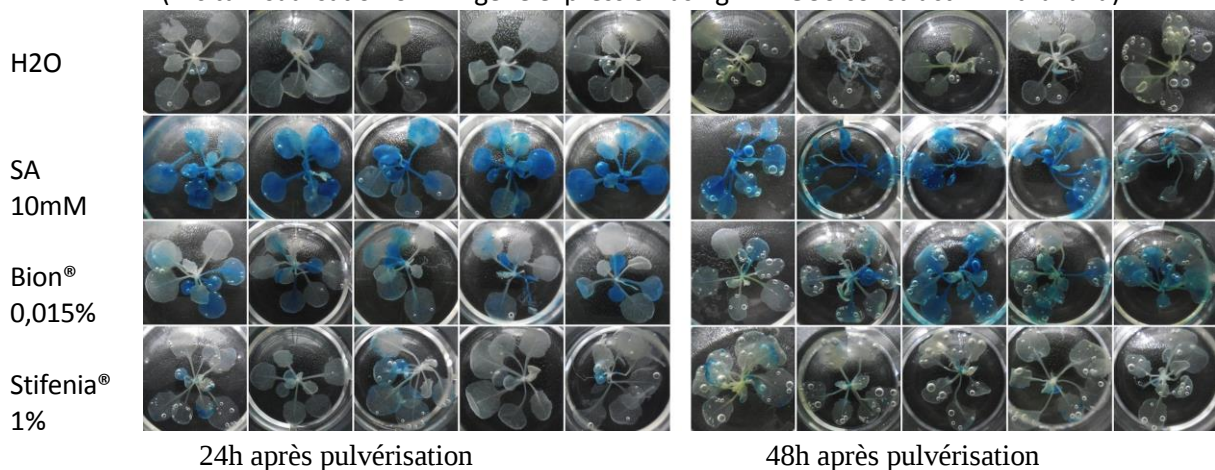
PRODUCTION DE MATERIEL VEGETAL ET VERIFICATION DE L'ELICITATION DES DEFENSES PAR LES SDP

Les extraits protéiques, qui doivent faire l'objet du test, sont préparés à partir de plantes sur lesquelles l'activation des défenses a été vérifiée. Pour cela, des plantes *PR1::GUS* sont cultivées *in vitro* durant 4 semaines puis pulvérisées avec différents éliciteurs ou SDP. Ces plantes sont ensuite prélevées à 24 ou 72 hpi pour coloration à l'aide du substrat X-Gluc.

Les plantes pulvérisées avec de l'eau ne montrent pas d'activation du gène *PR1* que se soit à 24 hpi ou 72 hpi. Les plantes pulvérisées avec du SA montrent une activation de ce gène quel que soit le temps post-inoculation observé. Les plantes pulvérisées avec du Bion® montrent une activation du gène *PR1* plus faible qu'avec le SA mais augmentant avec le temps. Les plantes pulvérisées avec du Stifenia® ne montrent pas d'activation du gène *PR1* que se soit à 24 hpi ou 72 hpi (Fig. 2).

Figure 2 : Visualisation *in situ* de l'expression du gène *PR1* à l'aide de la construction *PR1-GUS* d'*A. thaliana*

(*in situ* visualisation of *PR1* gene expression using *PR1-GUS* construct in *A. thaliana*)



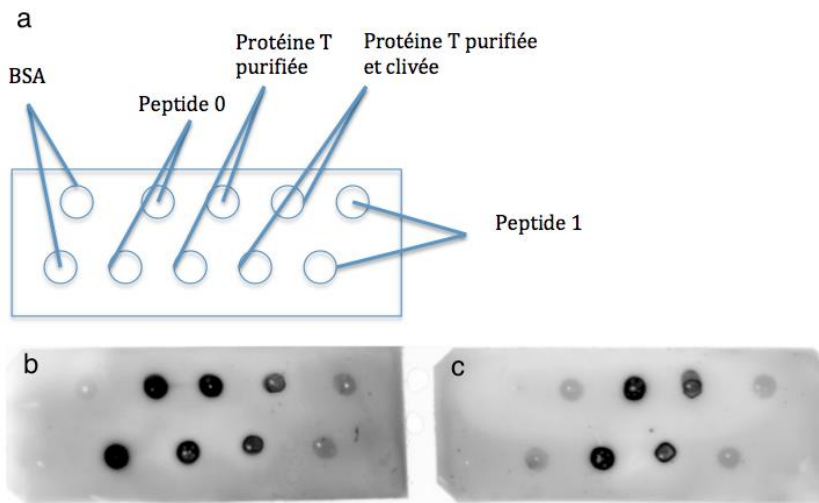
PRODUCTION D'ANTICORPS

STRATEGIE 1

Des séquences consensus de peptides ont été identifiées en alignant les séquences de la protéine d'intérêt de différentes espèces cultivées (monocotylédones et dicotylédones) et d'*A. thaliana* comme référence. En particulier, deux zones conservées ont été spécifiquement ciblées pour proposer des séquences consensus à une majorité de plantes cultivées sur la partie de la protéine inaccessible sous sa forme oligomérique (Fig. 1). Ces deux séquences peptidiques ainsi redéfinies (peptide 0 et peptide 1) ont ensuite été synthétisées par la société Genepep et utilisées pour immuniser des lapins. Les sérums obtenus ont été testés en dot blot. Ces sérums, issus des lapins immunisés vis-à-vis d'une part du peptide 0 (Fig. 3b) et d'autre part du peptide 1 (Fig. 3c), permettent de détecter chacun les peptides, ainsi que la protéine d'intérêt recombinante d'*A. thaliana* purifiée qu'elle soit clivée ou non, mais pas la BSA (albumine de sérum bovin ; protéine purifiée témoin. Les anticorps ciblant le peptide 0 (Fig. 3b) semblent plus spécifiques que les anticorps ciblant le peptide 1 (Fig. 3c) par rapport à leur peptide correspondant.

Figure 3 : Dots blots avec sérums
(Dots blots with serum)

a : Schéma de dépôt, b : Incubation avec sérum anti peptide 0, c : Incubation avec sérum anti-peptide 1.

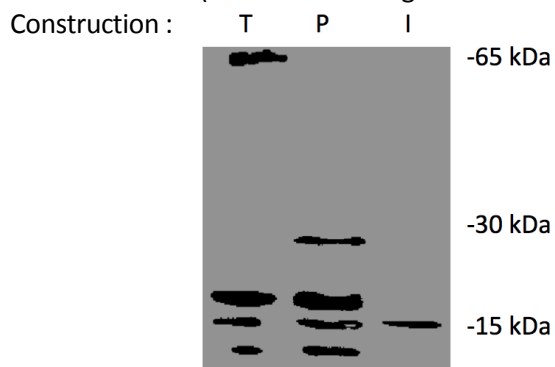


STRATEGIE 2

Les constructions permettant la production de la protéine recombinante d'*A. thaliana* soit totale (T), soit partielle (P) soit ciblant la partie d'intérêt (I) ont été réalisées à l'aide de la technologie Gateway™ et ont été vérifiées par séquençage.

Les protéines totales issues des bactéries possédant les différentes constructions sont vérifiées par western blot en utilisant un anticorps anti His-tag. Les résultats du western-blot montrent clairement que ces différents extraits contiennent bien les formes respectives de la protéine recombinante avec la détection des différentes formes aux tailles attendues (Fig. 4) via le tag Histidine.

Figure 4 : Westerns blots avec anticorps anti His-tag sur protéines recombinantes.
(Westerns blots against recombinant protéins with anti-His tag antibody).



En premier lieu, la protéine T a été purifiée et clivée car elle sert de témoin positif pour le test de reconnaissance spécifique en dot blots des anticorps produits par la première stratégie (peptides de synthèse). L'obtention des formes protéiques purifiées partielles et d'intérêt d'*A. thaliana* est actuellement en cours pour la préparation d'anticorps spécifiques de la protéine sous sa forme active.

DISCUSSION

Nous avons mis au point une méthode expérimentale, simple et peu coûteuse, qui permet de mettre en évidence l'activation des défenses. De façon attendue, les plantes traitées à l'acide salicylique (SA) ou avec du Bion® activent l'expression du gène *PR1* (Fig. 2) validant l'activation de la voie du SA. D'autre part, le Stifenia® étant un SDP décrit comme activant l'ISR (Kati, 2010), les résultats de notre expérimentation *in planta* sont cohérents avec la littérature puisque les plantes traitées avec ce composé n'activent pas l'expression du gène *PR1* (voie du SA). Afin de vérifier que ce produit est un SDP activant les défenses médiées par l'acide jasmonique et l'éthylène, le même test sera effectué avec des plantes possédant une construction GUS permettant de visualiser l'éllicitation de cette voie de défenses (*PDF1.2-GUS*).

Les sérums de lapin (contenant les anticorps) produits à partir des peptides synthétiques consensus permettent de reconnaître les peptides respectifs mais également la protéine d'intérêt totale (T) d'*A. thaliana* purifiée et/ou clivée (Fig. 3). Ces résultats sont prometteurs pour la suite des travaux sur extraits de plantes élicitées (*A. thaliana* et plantes cultivées). Cependant, les premiers résultats suggèrent que les anti-peptides ciblant le peptide 0 semblent plus spécifiques que les anti-peptides ciblant le peptide 1. Bien que prometteurs, ces anti-peptides nécessitent encore des étapes de purification afin d'être utilisés sur des extraits de plantes cultivées et élicitées. En effet, la spécificité de ces anti-peptides est primordiale pour la détection de la protéine cible dans différentes plantes cultivées et pas seulement sur *A. thaliana*.

Les constructions réalisées en système d'expression bactérien permettent bien de produire les trois formes souhaitées de la protéine d'intérêt (Fig. 4). En effet des protéines possédant un His-tag sont retrouvées à la taille attendue (65 kDa pour T, 30 kDa pour P et 17 kDa pour I). Les protéines T et P sont clivées naturellement au sein de la bactérie, ce qui explique les bandes de plus faible poids moléculaire observées en western-blot.

CONCLUSION

Nos travaux montrent que la production de matériel végétal élicité *in vitro* permet bien de tester l'activation des défenses des plantes. Les tests utilisant des plantes d'*A. thaliana* exprimant le gène GUS sous le contrôle du promoteur du gène *PR1* apparaissent comme des outils intéressants pour améliorer la compréhension des mécanismes mis en place par les différents SDP en laboratoire. En effet ils permettent de voir si les SDP élicitent les défenses systémiques et de manière plus ou moins spécifique selon les voies induites (SAR ou ISR). Le matériel végétal ainsi élicité par différents SDP et validé par la technique GUS sera utilisé pour tester les différents anticorps obtenus via les deux stratégies développées.

En effet, ces stratégies de production d'anticorps sont en cours de finalisation. Pour la première stratégie, les deux anti-peptides sont en cours de purification, même s'il apparait d'ores et déjà que les anticorps ciblant le peptide 0 sont plus spécifiques. Suite à cette étape, ils seront testés sur des extraits de protéines de plantes élicitées (*A. thaliana* et plantes cultivées).

Pour la deuxième stratégie, la purification et le clivage de la protéine totale ayant déjà été réalisés, les formes tronquées P et I sont actuellement en cours d'extraction pour permettre l'immunisation et l'obtention d'anticorps spécifiques de la forme active de la protéine d'*A. thaliana*. Cette stratégie doit permettre de trouver une séquence minimum nécessaire pour produire les anticorps spécifiques du monomère actif ciblé dans le but de valider la méthodologie globale sur la plante modèle *A. thaliana*. De plus, cette seconde approche pourra alors être transposée aux plantes cultivées (monocotylédones et dicotylédones) dans le cas où la première stratégie ne peut aboutir concrètement.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le LabEx "Sciences des Plantes de Saclay" pour le financement du projet dans le cadre du programme SPS'innov (<http://www.labex-sps.fr>).

BIBLIOGRAPHIE

- Choudhary DK., Prakash A., Johri BN., 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants : mechanism of action. *Indian J Microbiol* 47 : 289-297.
- Kati JE., 2010. Mécanisme de défense chez les végétaux et notion d'éllicitation : cas de *Cucumis melo* et d'un stimulateur de défenses naturelles le "Fen 560". Thèse de l'université Montpellier II.
- Jones JDG., Dangl JL., 2006. The plant immune system. *Nature* 444(7117) : 323-329.
- Kariola T., Palomäki TA., Brader G., and 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.