

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTÉGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

**QUANTIFICATION À HAUT DÉBIT DE L'EXPRESSION DES GÈNES DE DÉFENSE DE LA VIGNE AU
CHAMP À L'AIDE DE DISPOSITIFS DYNAMIQUES MICROFLUIDIQUES**

M.-C. DUFOUR ^{1*}, N. MAGNIN ¹, B. DUMAS ^{2,3}, S. VERGNES ^{2,3} AND M.-F. CORIO-COSTET ¹

¹ INRA, UMR Santé et Agroécologie du vignoble (SAVE-1065), CS 20032, ISVV, 33882 Villenave d'Ornon CEDEX, France.

² UNIVERSITE DE TOULOUSE, UPS, UMR 5546, Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, BP 42617 Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan, France

³ CNRS, UMR 5546, BP 42617, F-31326 Castanet-Tolosan, France

RÉSUMÉ

La lutte contre les maladies de la vigne due aux pathogènes biotrophes nécessite habituellement l'utilisation massive de fongicides chimiques ayant souvent des effets nocifs sur l'environnement. Pour comprendre et améliorer l'action des stimulateurs de défense des plantes (SDP), il est essentiel de développer des outils fiables qui décrivent l'état de résistance de la plante. Nous avons développé un outil pionnier (puce "NeoViGen96") basé sur une plateforme de réseaux dynamiques microfluidiques (Fluidigm[®] de BioMark HD[®]) permettant de visualiser le profil d'expression de 85 gènes de vigne liés à la défense dans 90 préparations d'ADNc. Les résultats sont obtenus en seulement 4h, avec une excellente reproductibilité et à un débit de 60 à 70 fois plus élevé et 6 fois moins cher que les essais classiques de Q-PCR. Avec cet outil, nous avons montré que les réponses de la vigne après l'élicitation par le BTH (acibenzolar-S-méthyl ou ASM) dans le vignoble étaient similaires à celles obtenues en laboratoire et à l'origine de l'effet protecteur sur la vigne, alors que nos résultats suggèrent que l'effet protecteur du FOS (aluminum tris-ethyl phosphonate) contre le mildiou dans le vignoble était seulement dû à son activité fongicide. Cet outil permettra de mieux comprendre comment la vigne répond à l'élicitation dans son environnement naturel et comment le potentiel de l'éliciteur peut être utilisé pour réduire les intrants fongicides chimiques conventionnels.

Mots-clés : Elicitation, *Plasmopara viticola*, réponses de défense, expression de gènes, expérimentation en vignoble.

ABSTRACT

HIGH-THROUGHPUT GENE-EXPRESSION QUANTIFICATION OF GRAPEVINE DEFENSE RESPONSES IN THE FIELD USING MICROFLUIDIC DYNAMIC ARRAYS

The fight against grapevine diseases due to biotrophic pathogens usually requires the massive use of chemical fungicides with often harmful environmental effects. To understand and to improve the elicitor's action, we need to develop reliable tools describing plant resistance status. We have developed a pioneering tool ("NeoViGen96" chip) based on a microfluidic dynamic array platform allowing the expression profiling of 85 defense-related grapevine genes in 90 cDNA preparations. The results are obtained in a 4h single run with an excellent reproducibility at a throughput 60 to 70 times higher and 6 times cheaper than conventional Q-PCR assays. With this tool, we showed that grapevine responses after BTH elicitation in the vineyard were similar to those obtained in laboratory conditions and responsible of plant protection, whereas our results suggest that the protective effect of FOS against downy mildew in the vineyard was only due to its fungicide activity. This tool will provide better understanding of how the grapevine replies to elicitation in its natural environment and how the elicitor potential can be used to reduce chemical fungicide inputs.

Keywords: Elicitation, *Plasmopara viticola*, vineyard experiments, gene expression, defense responses.

INTRODUCTION

La vigne cultivée en Europe (*Vitis vinifera*) est soumise à des maladies dues à de nombreux bioagresseurs, notamment des parasites fongiques et oomycètes tels que le mildiou (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). Le contrôle des épidémies nécessite de nombreux traitements chimiques ayant souvent des effets nocifs sur l'environnement et la santé humaine. Face à cette situation, en complément de l'amélioration des plantes et de la lutte biologique, l'utilisation de stimulateurs de défense des plantes (SDP ou éliciteurs) pourrait être une alternative prometteuse.

Agissant sur la plante et pas ou peu directement sur l'agent pathogène, les éliciteurs induisent une résistance multifactorielle des plantes qui est probablement plus difficile à surmonter par l'agent pathogène que la protection fournie par un seul site fongicide. Il existe une grande variété d'éliciteurs d'origine animale, végétale, fongique ou bactérienne. Il est même possible de trouver des produits SDP dont la matière active est un microorganisme vivant. Ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés pour identifier le mode d'action des éliciteurs sur divers modèles végétaux et identifier les gènes impliqués dans les réponses de défense de la plante.

Compte tenu de cette situation, une meilleure compréhension est nécessaire dans les réponses immunitaires de la vigne en fonction du contexte génétique de la plante, de la diversité des pathogènes et des conditions environnementales. Des études préliminaires dans notre laboratoire nous ont permis de sélectionner des éliciteurs potentiels à composition chimique définie et qui ont une efficacité reproductible stable dans des conditions contrôlées contre les deux pathogènes majeurs de la vigne: l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). Nous nous sommes particulièrement intéressés aux phosphonates et au benzothiadiazole (BTH ou acibenzolar-S-méthyl (ASM)), déjà connus comme stimulateurs des défenses des plantes. Le BTH s'est montré efficace contre un large spectre d'agents pathogènes dans différentes plantes, sans activité antifongique directe, ce qui établit clairement son rôle d'inducteur qui dépend de la voie de l'acide salicylique (SA).

Le Fosetyl-aluminium (FOS, [aluminium tris (éthylphosphonate)]) est un phosphonate utilisé contre les maladies causées par les oomycètes. Son mode d'action est complexe, avec un effet direct sur les pathogènes à fortes doses ainsi qu'une activité indirecte grâce à des réponses améliorées à la défense des plantes à faibles doses. Les phosphonates ont été largement étudiés pour leur rôle d'inducteur de la phytoalexine.

Il est possible d'évaluer l'effet inducteur des défenses de ces composés sur le terrain en analysant l'expression d'un nombre significatif de gènes marqueurs impliqués dans le processus de défense de la vigne. Récemment, deux outils de diagnostic moléculaire ont été conçus pour fournir des informations sur l'état de défense de la vigne: la puce « qPFD » et la puce « BioMolChem ». La puce « qPFD » (microplaque de RT-PCR quantitative / puce à ADN de faible densité) qui a été développée pour la première fois sur le modèle de mâche et de pommier (*Malus domestica* / *Venturia inaequalis*) a été étendue à la vigne. Elle évalue un ensemble de neuf groupes représentant 28 gènes cibles (brevet INRA WO 2011/161388, CT / FR2011 / 051470 - INRA Angers - Brisset MN) ;. La puce "BioMolChem" qui est basée sur 20 gènes marqueurs fortement impliqués dans les mécanismes de défense de la vigne a également été conçue par une équipe de l'INRA de Bordeaux (Dufour *et al*, 2013). Cependant, un outil de diagnostic plus précis exigerait certainement un plus grand nombre de marqueurs de défense puisque les analyses génomiques ont montré que l'induction du système immunitaire de la plante est liée à des changements dans l'expression de milliers de gènes. Récemment, des progrès considérables ont été réalisés dans le développement de plates-formes automatisées permettant l'analyse à haut débit de l'expression génétique par Q-PCR, impliquant notamment des puces microfluidiques.

Nous décrivons ici la construction d'une nouvelle puce, "NeoVigen96", permettant la détection de 85 marqueurs de défense et de 11 gènes utilisés pour la normalisation de l'expression (gènes exprimés de manière constitutive) sur 95 préparations d'ADNc en une seule opération. La puce a été utilisée pour étudier l'activité inductrice du BTH et du FOS dans des feuilles recueillies sur le terrain.

L'idée générale de ce travail n'est pas de démontrer que ces applications BTH et FOS devraient être utilisées telles qu'elles sont réalisées dans cet article dans le contexte des programmes conventionnels

de protection de la vigne, mais de démontrer qu'il est possible de tester les effets des potentiels produits éliciteurs sur les réponses de défense de la vigne grâce à l'outil (puce NéoViGen96) développée avec la technologie Fluidigm-BioMark HD[®]). Les données obtenues permettent une meilleure compréhension de l'état de défense de la vigne en vue d'optimiser le potentiel des éliciteurs de défense des plantes.

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL VEGETAL, TRAITEMENTS ET INOCULATION

Des expériences ont été effectuées dans le vignoble expérimental de Couhins qui couvre 45 hectares et est situé près de Bordeaux (appellation Pessac-Léognan). Les tests ont été réalisés dans le cadre d'un essai de 4 répétitions organisées en 4 blocs randomisés avec 3 plants de Cabernet Sauvignon par répétition. Trois conditions ont été étudiées: non traitées, traitées chaque semaine avec 1 Kg Ha⁻¹ d'ingrédient actif de BTH (Acibenzolar-S-méthyl 50%, Bion[®] 50WG, Syngenta) ou traitées avec 2,5 Kg Ha⁻¹ d'ingrédient actif de fosetyl aluminium Fosetyl-Al 80%, Aliette[®] Flash, Bayer).

Les traitements ont débuté le 3 mai 2011 au stade phénologique 13-14 sur l'échelle BBCH (3-4 feuilles dépliées) et ont été arrêtés, après 12 traitements, le 19 juillet 2011 à l'étape 79 (fruits et baies ayant atteint la taille finale) (Figure 2). Les plantes ont été inoculées artificiellement avec *P. viticola* le 19 mai 2011 au stade 55 (gonflement des inflorescences, fleurs serrées), 24 h après le quatrième traitement, par pulvérisation de 6 feuilles, avec une solution de sporanges (25 000 à 45 000 sporanges ml⁻¹). Douze feuilles à un stade similaire, issues des 4 répétitions de 3 ceps, ont été prélevées pour chaque modalité le 12 mai 2011 (2 jours après le deuxième traitement qui a eu lieu le 10 mai), divisées en trois répétitions biologiques de quatre feuilles et congelées à -80 °C jusqu'à leur utilisation pour l'analyse moléculaire. De plus, cinq prélèvements de feuilles ont été réalisés tout au long de la saison: avant le traitement pour vérifier l'homogénéité de la parcelle (S1), 48 heures après le deuxième traitement (S2), 48 heures après le troisième traitement et juste avant l'inoculation artificielle (S3), 48 heures après l'inoculation artificielle (S4), puis plus tard, 48 heures après le septième traitement (S5). Dans cet article, nous ne rapportons que les résultats obtenus avec le second prélèvement, avant l'inoculation de *P. viticola*, qui était le seul à être analysé avec les deux technologies (Stratagene utilisée dans BioMolChem et Biomark HD[®]).

MESURE SUR LE TERRAIN DE L'EFFET DU FOSETYL D'ALUMINIUM ET DU BTH SUR LA MALADIE DU MILDIU

La sévérité du mildiou (pourcentage moyen d'attaque) a été évaluée 6 fois, à partir du 9 juin, après 6 traitements, 4 semaines après l'inoculation artificielle en évaluant le niveau d'attaque de 30 feuilles par bloc selon la méthode CEB n ° 007: Méthode d'efficacité pratique pour les essais fongicides destinés à lutter contre la moisissure (*Plasmopara viticola* (B. C) Berl et Tomi).

Les données de la courbe de progression de la maladie ont été transformées en une seule valeur par une formule développée par Simko et Piepho (2012) , qui calcule la superficie sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC):

$$AUDPC = \sum_{(i=1)}^{(n-1)} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

Toutes les grappes de chaque bloc expérimental ont été recueillies le 11 octobre 2011, comptées et pesées pour évaluer le rendement. Cela a permis d'évaluer le nombre moyen de grappes produites ainsi que le poids moyen des grappes. De plus, 100 baies par modalité, choisies au hasard parmi celles récoltées sur les 4 répétitions de 3 ceps, ont été pesées pour évaluer le poids moyen d'une baie.

CHOIX DES AMORCES DE QPCR

Les séquences d'ARNm des gènes étudiés ont été extraites de la base de données génétiques du Centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI) ou de la base de données des voies des gènes et des

génomomes de Kyoto (KEGG) avec *Vitis vinifera* comme génome de référence. Pour la conception des amorces, le logiciel libre Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) a été utilisé.

La spécificité des paires d'amorces a été vérifiée par analyse de la courbe de fusion et électrophorèse sur gel du produit amplifié (données non présentées). On a déterminé les efficacités de PCR des amorces dessinées avec une série de dilutions en 5 points d'un pool d'échantillons de l'expérience dans des triplicats de qPCR, en accord avec les MIQE décrit par Bustin *et al.* (2009).

EXTRACTION D'ARN ET TRANSCRIPTION REVERSE

L'extraction d'ARNs a été réalisée selon le protocole décrit par Reid *et al.* [52] à partir de feuilles congelées stockées à -80 ° C. Trois réplicats biologiques par traitement (non traité, BTH et FOS) ont été extraits. Après broyage dans de l'azote liquide, un tampon d'extraction (20 g.mL⁻¹) préchauffé à 56 ° C (Tris HCl 300 mM, pH 8,0, EDTA 25 mM, NaCl 2 mM, 2% CTAB, poly-vinyl poly-pyrrolidone (PVPP), 0,05% de trihydrochlorure de spermidine et 2% de b-mercaptoéthanol ajouté extemporanément) a été ajouté à la poudre de feuilles. Le mélange a été agité vigoureusement et incubé dans un bain d'eau à 56 ° C pendant 10 minutes sous agitation régulière. Un volume égal de chloroforme: alcool isoamylique (24: 2, v / v) a été ajouté et ensuite centrifugé à 3500 g pendant 15 minutes à 4 ° C.

Les étapes d'extraction d'ARN suivantes ont été réalisées en utilisant le protocole Spectrum™ Plant Total RNA Kit. Les ARN purifiés ont été élués dans de l'eau exempte de RNase. Les quantités d'ARN obtenues ont été mesurées à 260 nm et 280 nm par spectrométrie (spectrophotomètre NanoDrop 1000, France). L'intégrité de l'ARN a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose ou par passage sur un bioanalyser (technologie Agilent, France). La RT-qPCR a été réalisée selon les recommandations du MIQE (information minimale pour la publication des expériences de PCR en temps réel quantitatif).

Dix microgrammes d'ARNs ont été rétrotranscrits en utilisant 2 µM d'oligo-d (T)₁₅, d'inhibiteur de ribonucléase et de transcriptase inverse M-MLV (Promega, France) selon les instructions du fabricant dans un volume final de 900 µl avec une concentration finale entre 70 et 150 ng mL⁻¹. Les ADNc obtenus ont ensuite été stockés à -20 ° C.

ANALYSE D'EXPRESSION QPCR EN TEMPS REEL

Avec le système stratagene MX3005P

L'expression des gènes sélectionnés a été évaluée en utilisant un système qPCR de Stratagene Mx3005P (technologies Agilent) avec le SYBR Green pour détecter la synthèse d'ADNdb. Pour chaque réaction, 1 µL de chaque amorce à 1 µM et 7 µL de 2 x MESA BLEU qPCR MasterMix Plus pour SYBR® Assay Low ROX (Eurogentec) et 5 µL d'ADNc ont été utilisés selon les instructions du fabricant (350 à 750 ng d'ADNc par puits). Chaque réaction PCR a été effectuée en double. La PCR a été réalisée à 94 ° C pendant 15 min, suivie par 40 cycles à 95 ° C pendant 10 s, 55 ° C pendant 20 s et 72 ° C pendant 20 s. Les données ont été analysées avec le logiciel MxPro QPCR (Agilent technologies).

Pour chaque gène et pour chaque modalité, une valeur de Cq moyen (cycle quantification) est obtenue, représentant la valeur du nombre de cycle de qPCR à partir duquel le seuil de fluorescence devient significativement différent du bruit de fond. L'expression relative (ER) des gènes est ensuite calculée en appliquant la formule suivante (Germer *et al.*, 2000): $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (modalité étudiée) - ΔCt (modalité témoin). Les valeurs Cq > 30 ont été considérées comme non valides et traitées comme des données manquantes.

Avec le système BioMarkHD®

Onze gènes ont été inclus dans le réseau qPCR en tant que gènes de référence endogènes. Une plaque 96.96 Dynamic Array IFC a également été utilisée pour analyser les niveaux d'expression des gènes sélectionnés. L'ADNc a d'abord été pré-amplifié avant d'être analysé par qPCR avec la technologie Fluidigm: les ADNc ont été dilués à ~ 5 ng / µL et la pré-amplification a été réalisée en ajoutant le mélange réactionnel contenant 96 couples d'amorces (pool d'amorces, 50 mM) et le Master Mix TaqMan PreAmp (1: 2, Applied Biosystems) avec 14 cycles de 95 ° C pendant 15 secondes et 60 ° C pendant 4 minutes. L'ADNc pré-amplifié a été dilué avec du tampon TE (1: 5) et utilisé pour l'analyse de

qPCR dans un mélange réactionnel contenant du réactif de transfert d'échantillon de colorant de liaison de DNA (Fluidigm, Issy les Moulineaux, France), du Master Mix d'expression de gène TaqMan (Applied Biosystems), et de l'EvaGreen (Interchim, Montluçon, France).

La qPCR en temps réel a été réalisée en utilisant un système BioMark™ HD (Fluidigm Corporation). Le tableau dynamique 96.96 a été utilisé pour la qPCR, selon le protocole du fabricant (<http://www.fluidigm.com/user-documents>). Cinq µL de mélange ont été préparés pour chaque échantillon contenant 1x mélange universel TaqMan (sans UNG), 1x réactif de chargement d'échantillon GE (Fluidigm PN 85000746) et chaque ADnc pré-amplifié dilué. La puce chargée a été placée dans le système BioMark pour PCR à 95 ° C pendant 10 min, suivie par 40 cycles à 95 ° C pendant 15 s et 60 ° C pendant 1 min. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de PCR BioMark 2.0 (Fluidigm Corporation, France) en appliquant le même principe de PCR classique en temps réel qu'avec le système Stratagene MX3005P où une valeur de Cq (cycle de quantification) est déterminée.

Les taux d'expression ont été calculés sur la base d'une méthode de normalisation de gènes multiples et en utilisant les principes et formules de Vandesompele *et al.* (2002).

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel BioMark 2.0 Analysis (Fluidigm Corporation).

Après achèvement de l'essai, une courbe de fusion des produits amplifiés a été déterminée pour confirmer la spécificité des réactions.

ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel statistique R (R Development Core Team, 2010). Les données d'AUDPC (évolution de la maladie du mildiou) et les données de rendement à la récolte ont été comparées avec une analyse de variance (ANOVA) et les différences significatives ont été déterminées par le test de Tukey au niveau de $P \leq 0,05$. Pour modéliser la relation entre les expressions géniques obtenues avec les deux plates-formes, une analyse de régression linéaire a été réalisée et une corrélation de Pearson a été déterminée à un niveau de p-valeur $\leq 0,05$.

Les gènes ont été observés comme étant différentiellement exprimés pour une valeur de $p < 0,05$ dans des comparaisons multiples non paramétriques basées sur le rang avec le paquet "nparcomp" dans le logiciel statistique R. Des différences significatives ont été déterminées par le test de Dunnett au niveau de $p \leq 0,05$.

Une procédure mathématique qui transforme un certain nombre de variables éventuellement corrélées (expressions génétiques) en un plus petit nombre de variables non corrélées, appelées composantes principales, a été effectuée pour analyser le comportement de défense des plantes après élicitation avec le paquet "Rcmdr" et le plug-in "FactoMiner" du logiciel R.

Une analyse des similarités (ANOSIM) a été effectuée pour tester la différence entre les deux méthodes utilisées (Fluidigm vs Stratagene) à l'aide du logiciel «vegan» de R.

RESULTATS ET DISCUSSION

CONCEPTION DE LA PUCE "NEOVIGEN 96" ET VALIDATION

De nouvelles données génomiques de vigne ont été ajoutées aux gènes déployés dans deux outils de diagnostic moléculaire récemment mis au point ("grapevine - qPFD" INRA FR 1055042 / WO / 2011/161388, CT / FR2011 / 051470 - INRA Angers - Brisset MN (de Bernonville *et al.*, 2014), et puce "BioMolChem" (Dufour *et al.*, 2013)).

96 nouvelles séquences *Vitis* ont été choisies, comprenant des gènes de référence (N = 11), des gènes codant pour des PR protéines (N = 28), certains gènes impliqués dans le métabolisme secondaire (phénylpropanoïdes, N = 15) et la voie de l'indole (N = 5), d'autres impliqués dans le système d'oxydoréduction (N = 5), dans les voies d'éthylène ou d'oxylipine / JA (N = 4), le renforcement de la paroi cellulaire (N = 13) et d'autres impliqués dans la détection et la signalisation (N = 15) (Dufour *et al.*, 2016).

Nous avons vérifié que la qPCR était spécifique pour chaque ensemble d'amorces (cible spécifique appropriée), en vérifiant la taille appropriée du produit amplifié sur gel d'agarose et l'obtention d'un seul pic dans la courbe de fusion réalisée après chaque essai qPCR. Nous avons également vérifié que

les efficacités de PCR pour chaque ensemble d'amorces étaient similaires (0,8 à 1,2), ce qui nous a permis de simplifier la formule modèle de Pfaffl (2001) pour calculer l'expression relative avec $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (données non présentées).

SENSIBILITES DES METHODES

Les valeurs de Cq obtenues sur un sous-ensemble de 23 gènes ont été comparées pour les mêmes échantillons dans deux systèmes PCR en temps réel: le Stratagene Mx3005P et le Biomark HD, un Fluidigm® integrated fluidic circuits (IFCs) en automatisant les réactions PCR dans des volumes de nanolitres.] Vingt-deux des 23 ARNm présentaient des valeurs Cq plus faibles dans le réseau dynamique Fluidigm que celles obtenues avec le Stratagene MX3005P ($15,60 \pm 0,42$ pour le tableau dynamique 96,96 et $19,54 \pm 0,42$ pour le Stratagene, différence moyenne, $3,96 \pm 0,17$), ce qui suggère que La technologie microfluidique présentait une plus grande sensibilité que la Stratagene tandis que les quantités d'ADNc utilisées dans cette technique étaient 70 à 150 fois plus faibles (Dufour *et al.*, 2016, BMC genomics).

COMPARAISON DES NIVEAUX D'EXPRESSION DES MRNA OBTENUS AVEC LES DEUX TECHNOLOGIES (BIOMARK ET STRATAGENE Mx3005P)

Nous avons comparé les niveaux d'expression des gènes liés à la défense dans les mêmes échantillons obtenus par la technologie Fluidigm avec ceux obtenus avec le système Stratagene Mx3005P. Une très bonne corrélation ,significative, a été obtenue entre les deux technologies ($R^2 = 0,737$ et corrélation de Pearson (PPMCC) = 0,86; p-valeur <0,05). Le maximum d'expression détecté par Stratagene était de 2,59 comparé à 2,28 avec la technologie Fluidigm (Figure 1).

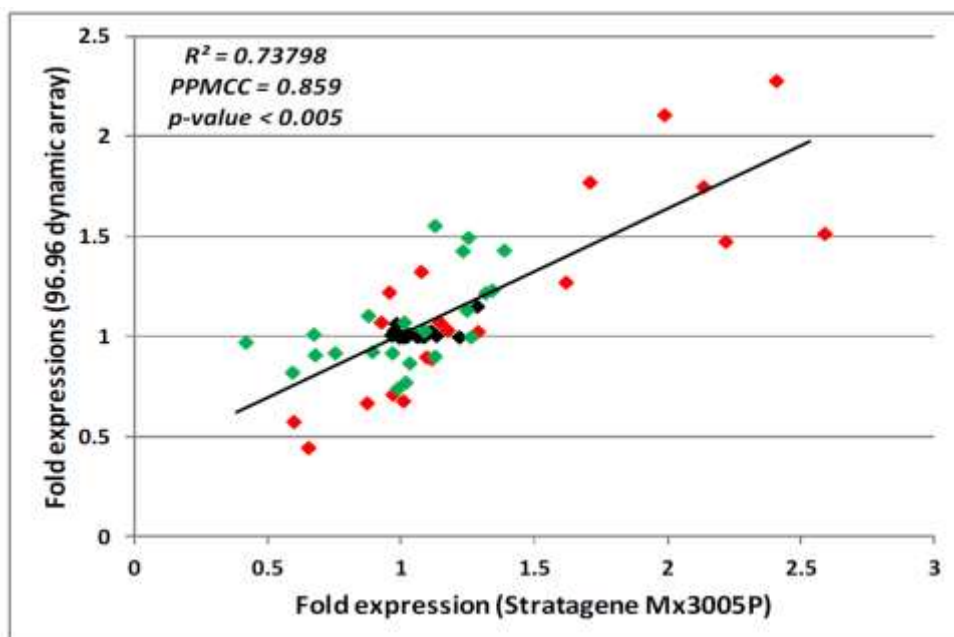


Figure 1: Diagramme de corrélation des niveaux d'expression des gènes obtenus avec le système Stratagene ou Biomark HD obtenus avec trois répétitions de feuilles traitées avec le BTH (rouge), avec le FOS (vert) ou non traitées (noires). (Correlation scatter plots of fold expression of "BioMolChem" chip genes (n=24) using Stratagene or Biomark HD systems obtained with three replicates of leaves treated with BTH (red), with FOS (green) or untreated (black).)

L'outil moléculaire utilisé pendant plusieurs années dans les tests précédents (puce "BioMolChem" ou puce "qPFD" avec les systèmes de qPCR classique comme Stratagene) était limité lorsque nous voulions tester l'état de défense de la vigne dans le vignoble. Nous avons besoin d'augmenter le débit des analyses d'expression génique. Nous avons développé l'outil NeoViGen avec le système Fluidigm® de BioMark HD® et nous soulignons sa puissance, qui a un débit de 60 à 70 fois plus élevé

et utilise des quantités d'ADNc de 70 à 150 fois plus petites qu'avec les tests conventionnels de qPCR. Seul le deuxième échantillon de ce test de terrain a été analysé par les deux technologies.

PROTECTION INDUITE DE LA VIGNE APRES TRAITEMENT AU BTH ET FOS

Des études précédentes ont montré que le mode d'action du BTH est uniquement par stimulation des défenses des plantes, alors que celui du FOS est plus complexe, avec des effets directs et indirects. Des études antérieures ont montré que ce mode complexe dépend de la dose appliquée par le trempage du sol (, avec un effet indirect à faible dose (<10 mM) et un effet direct à haute dose (> 50 mM). Dans notre étude, le FOS a été appliqué sur le feuillage de la vigne à la dose autorisée (2,5 kG Ha⁻¹ correspondant à 7,05 mM) pour laquelle une action directe a déjà été démontrée conduisant à une inhibition de 87,5% de la germination des spores de mildiou à une dose 5 fois plus faible (1,13 mM). Le traitement des feuilles de vigne avec du BTH et du FOS dans des conditions de champ a conduit à une réduction significative des symptômes de mildiou en comparaison avec les feuilles témoins non traitées, avec une meilleure efficacité du FOS (Figure 2). La zone sous les courbes de progression de la maladie, qui résume les données répétées comme le changement d'intensité d'une épidémie en tant que valeur unique (AUDPC), était respectivement de 55% et 45% inférieure à celle des témoins non traités (Figure 3) .

BTH et FOS ont eu un effet protecteur significatif sur les feuilles de vigne ($5,2\% \pm 1,6$ et $12,4\% \pm 2,5$ de sévérité de mildiou respectivement contre $39,3\% \pm 2,8$ sur témoin non traité) et sur les baies de raisin ($2,82\% \pm 0,83$ et $2,54\% \pm 0,67$ de la sévérité du mildiou respectivement comparé à $38,8\% \pm 2,35$ sur le témoin non traité, données non présentées) et la récolte était 3,3 fois plus élevée dans les vignes traitées avec FOS ou BTH (moyenne FOS-BTH de 1637 ± 280 g avec $17,5 \pm 2,9$ grappes par parcelle) que dans les vignes non traitées (496 ± 165 g avec $8,5 \pm 2,3$ grappes par stock). Les raisins récoltés à partir de plantes traitées avec BTH étaient 2 fois plus petits que ceux récoltés à partir de plantes traitées avec FOS, mais identiques aux raisins récoltés dans les plants non traités (respectivement $163,4 \pm 27,3$ g et $336,5 \pm 33,4$ g par grappe) avec des baies 1,5 fois plus petites que celles de plantes traitées avec FOS et non traitées ($0,97 \pm 0,03$ g, $1,46 \pm 0,02$ g par baies, respectivement) (tableau 3). Aucune différence n'a été observée dans le pH, l'acidité et dans la teneur en sucre (données non présentées).

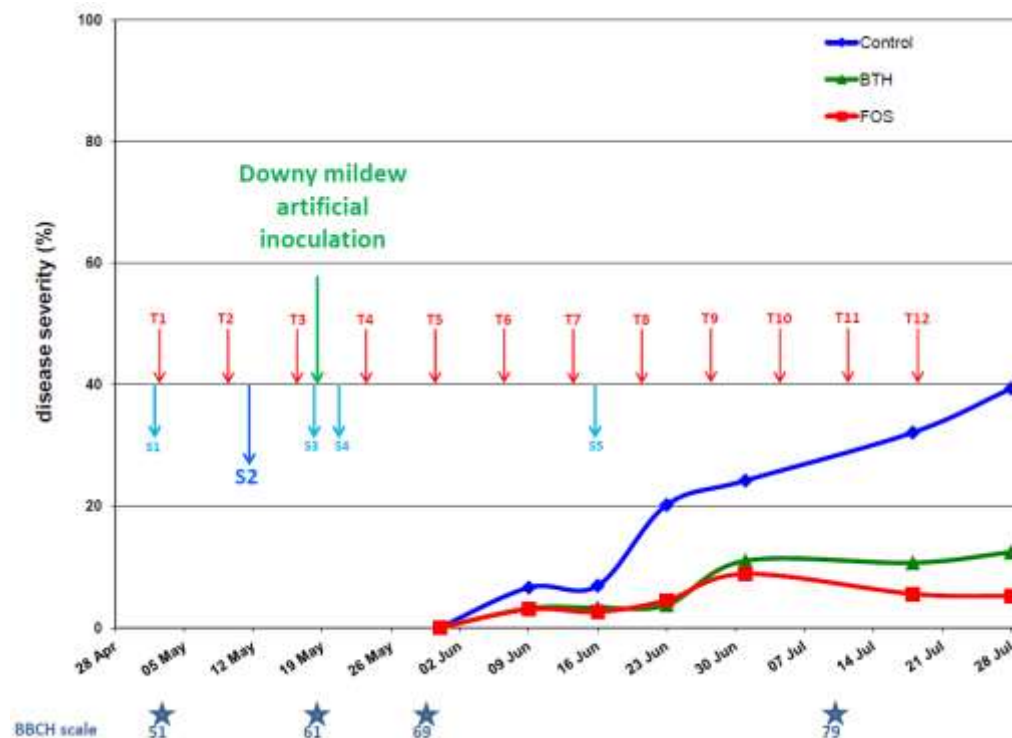


Figure 2 : Efficacité des inducteurs potentiels de défense sur les feuilles contre le mildiou de la vigne (*P. viticola*). (Efficacy of potential defense inducers on leaves against grapevine downy mildew (*P. viticola*)).

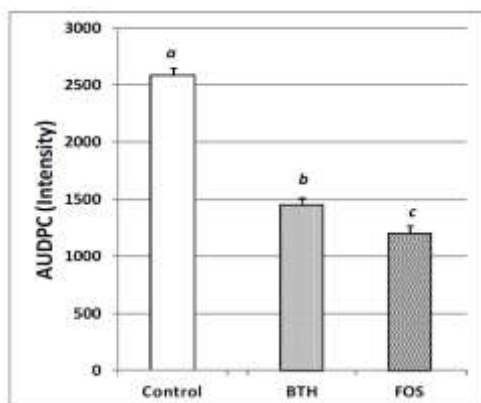


Figure 3: Aire sous la courbe de progression de la maladie. (Area under the disease progress curve (AUDPC)).

LES EXPRESSIONS GENETIQUES LIEES A LA DEFENSE DANS LES FEUILLES DE VIGNE TRAITEES AU BTH

Dans les expressions des gènes codant pour les PR-protéines (Figure 4), le traitement par BTH a déclenché la surexpression (RE > 1,2) des transcrits de PR1 (PR1 et 1bis), des glucanases (PR2 et GLU), des chitinases (PR3, CHIT3, CHIT4 et PR4) et d'une serine protease (PR6 et 6bis) et la répression (RE < 0,8) d'une autre serine protease (PIN). Le traitement par BTH a également conduit à la répression d'endoprotéases de type subtilisine (PR7-7bis), de type ribonucléase (PR10), de type défensine (PR12) et des gènes protéine-oxalate oxydase de type germine (PR15-15bis) (Tableau 4 et Figure 7). Parmi les gènes impliqués dans le renforcement des parois cellulaires, la BTH a conduit à la régulation positive (RE > 1,2) de l'alcool coniféryl glucosyl transférase (CAGT) et de la peroxydase formant de la lignine (PER) et à la répression (RE < 0,8) de l'autre CAGT2. BTH a également conduit à la régulation positive (RE > 1,2) de l'allinase (Alli2) qui participe à la production de composés volatils. Les résultats ont également montré l'expression différentielle des gènes impliqués dans les voies des métabolites secondaires, indoles et ET / JA (Tableau 4 et Figure 7), avec la surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse du stilbène (PAL, STS, ROMT) dans l'isoprénoïde Biosynthèse (FAR) et dans la biosynthèse des oxylipines dont la JA (LOX9 et LOX3) et la répression des gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (CHI et CHI2, LDOX et F3H), dans la voie de l'indole (CHORS2) et rédox (GST1 et GST4) .

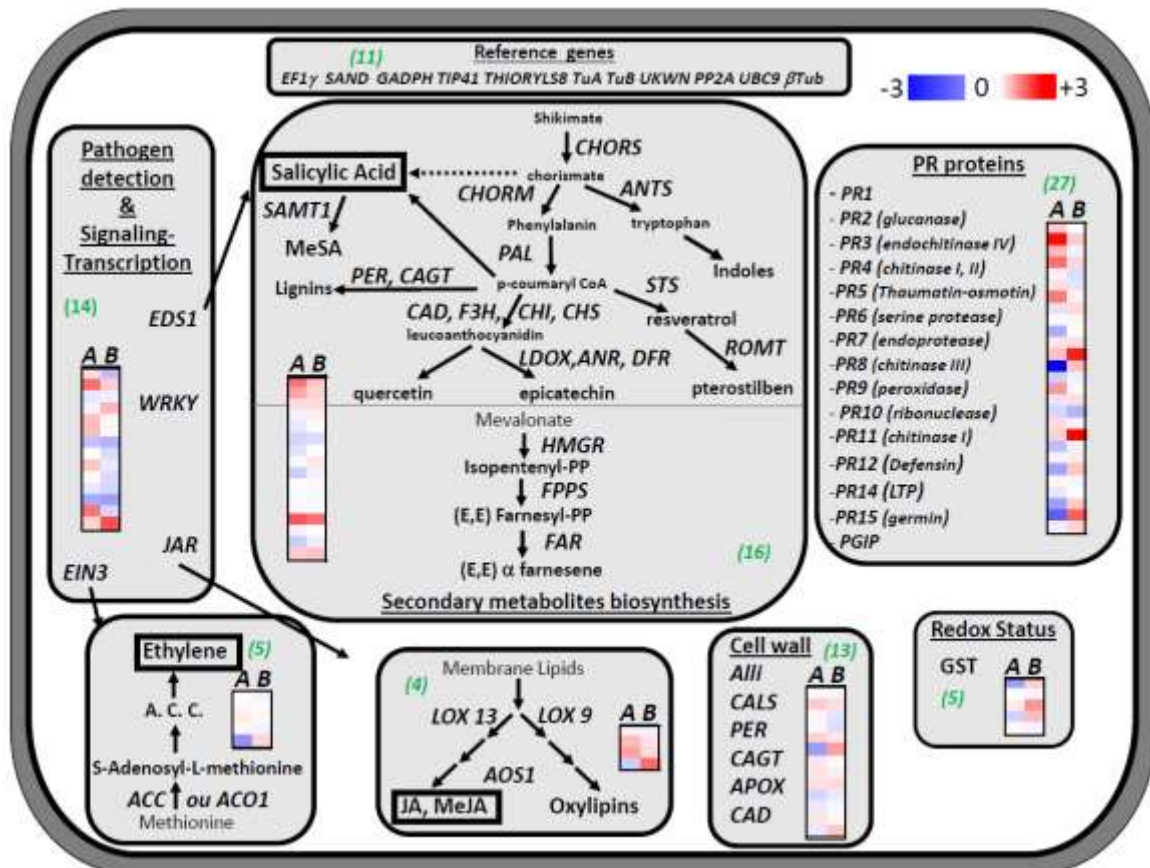


Figure 4: "Heatmap" représentant l'expression relative des gènes après transformation Log_2 . ("Heatmap" representing relative expression of genes in Log_2 transformations.)

Les niveaux d'expression de 85 gènes liés à la défense impliqués dans la détection-signalisation-transcription pathogène ($n = 10$), dans la biosynthèse des métabolites secondaires ($n = 26$), codant pour les protéines PR ($n = 29$), impliqués dans le renforcement des parois cellulaires = 13 dans la biosynthèse des oxylipines / JA et ET ($n = 3$) et le statut redox ($n = 5$) ont été évalués en utilisant une méthode relative à la normalisation de gènes multiples (11 gènes) dans des feuilles de vigne traitées par BTH (A) ou FOS (B) par rapport aux feuilles non traitées. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm écart-type de trois répétitions biologiques indépendantes. Le gradient de couleur allant du bleu pour les gènes réprimés ($\text{Log}_2(\text{RE}) < 0$), au rouge pour les gènes surexprimés ($\text{Log}_2(\text{RE}) > 0$) et blanc pour les gènes ne présentant aucune modification dans leur expression ($\text{Log}_2(\text{RE}) = 0$). Nombre entre parenthèses: nombre de gènes impliqués dans la fonction.

Le traitement par BTH induit la modulation de 14,1% des gènes étudiés, dont 58,3% sont régulés à la hausse avec une surexpression significative des gènes codant pour PR1-1bis, PR2, PAL et STS et une répression significative du gène codant pour PR7bis et LDOX Et F3H (tableau 1).

Tous ces résultats corroborent notre étude précédente montrant que la BTH augmente la résistance contre *P. viticola* en régulant à la hausse les protéines PR (PR1, PR2 et PR3). Le gène le plus induit était PR1 qui est habituellement signalé comme un marqueur typique de SAR. Une surexpression rapide de trois gènes codant pour des enzymes clés a été observée dans la voie de phénylpropanoïde (PAL et STS) et dans la voie de biosynthèse de SA (PAL). Un gène GST codant pour une enzyme impliquée dans le statut redox de la plante et un gène ACC impliqué dans la voie de l'éthylène était également fortement régulé à la hausse. La même voie de réponse de défense peut donc être observée dans les feuilles de vigne dans le vignoble à celle observée en laboratoire.

LES EXPRESSIONS GENETIQUES LIEES A LA DEFENSE DANS LES FEUILLES DE VIGNE TRAITÉES AU FOS

Lors du traitement par FOS, seuls les gènes EDS1a et ACO1a ont été significativement régulés et une répression significative d'un gène de régulation EIN3-dépendante de la signalisation de l'hormone de

l'éthylène végétale (EIN3bis) et des gènes impliqués dans la résistance JA-dépendante (JAR2) observé.

Le niveau d'expression des gènes liés à la défense dans les feuilles traitées avec FOS était moins intense qu'avec le BTH, avec seulement 8,2% de gènes différenciés, dont 25% étaient régulés à la hausse. Le traitement par FOS a induit une surexpression de PR1-PR2, moins forte que pour le BTH (significative dans le traitement BTH mais non dans le traitement par FOS), une répression de PR3, alors que ce gène était surexprimé avec le BTH, et enfin une réduction de PR7bis moins forte que pour le BTH. Les gènes codant pour PR7, PR12 et PR15 dans des feuilles traitées avec un traitement par FOS ont été surexprimés alors qu'ils étaient réprimés suite au traitement avec le BTH.

Alors que les deux gènes majeurs de la voie biosynthétique des phénylpropanoïdes (PAL et STS) ont été significativement surexprimés dans les feuilles traitées avec BTH, seul le gène de la PAL, qui est également impliqué dans la voie SA, a été différentiellement sur-exprimé dans les feuilles traitées avec FOS, avec expression des niveaux deux fois et cinq fois plus élevés dans les feuilles traitées au BTH que dans les sujets traités par FOS et les témoins non traités, respectivement. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues dans des expériences antérieures menées en laboratoire en conditions contrôlées où PAL et STS ont été signalés comme étant des gènes majeurs dans la résistance de *Vitis vinifera*.

L'analyse des composantes principales (PCA) a été utilisée pour résumer les façons dont les réponses de défense génique varient après l'élicitation. La plus grande partie de la variance dans le jeu d'expressions de la défense a été contenue dans les deux premières composantes principales qui ont capturé ~ 60% de la variabilité totale. Les résultats de l'ACP basés sur le sous-ensemble des 24 gènes liés à la défense de *Vitis vinifera* communs aux deux technologies ont résumé les 18 échantillons projetés sur les deux composantes principales (Figure 5). L'analyse statistique des similitudes (ANOSIM) n'a montré aucune différence significative entre les analyses d'expression génique réalisées avec le système Fluidigm et le système qPCR Stratagene Mx3005P ($p = 0,95$). L'axe 1 discrimine les modalités traitées par le BTH des 2 autres modalités (témoins non traité et plantes traitées par FOS), marquées par une surexpression significative des gènes *STS-PAL-LOX-GLU-CHIT3-PER* et *CHIT4* et une répression significative *CHI-PGIP-LDOX-F3H-GST* et *PIN* dans ces échantillons. Par contre, bien que les variables *PR10-ANTS-CHI-ACC-CHIT4-LDOX-PR1-CHIT3-GLU* et les gènes *CALS* contribuent de manière significative à l'axe 2, aucune modalité particulière n'a été significativement corrélée avec cet axe 2 (Figure 5). Les ellipses de confiance autour des catégories de traitements ont révélé deux groupes significatifs: le groupe A avec les échantillons témoins et les échantillons traités avec le FOS et le groupe B uniquement avec les échantillons traités au BTH.

Les analyses d'expression génétique effectuées sur des feuilles échantillonnées 48 heures après l'inoculation du mildiou ont montré que le traitement par BTH a continué à moduler 33,3% des gènes étudiés ($N = 24$ dans le système Stratagene), dont 87% sont significativement sur-exprimés (données non représentées). L'efficacité significative du traitement BTH semble être due à la stimulation des défenses de la vigne, apportant un niveau de protection significatif mais inférieur à celui du FOS.

D'autre part, les réponses de défense de la vigne à l'attaque du mildiou dans les plantes traitées avec FOS ont entraîné une modulation de 71% des gènes étudiés et 83% ont été significativement réprimés (données non présentées). Ces résultats sont cohérents avec les études précédentes (Dufour *et al*, 2013), où le pathogène modulait les défenses des plantes en sa faveur, y compris la suppression des gènes de défense. À la concentration utilisée (2,5 kG Ha⁻¹), l'efficacité du FOS observée dans cet essai est probablement principalement due à un effet fongicide en raison du faible niveau d'expression génétique liée à la défense par rapport au témoin non traité.

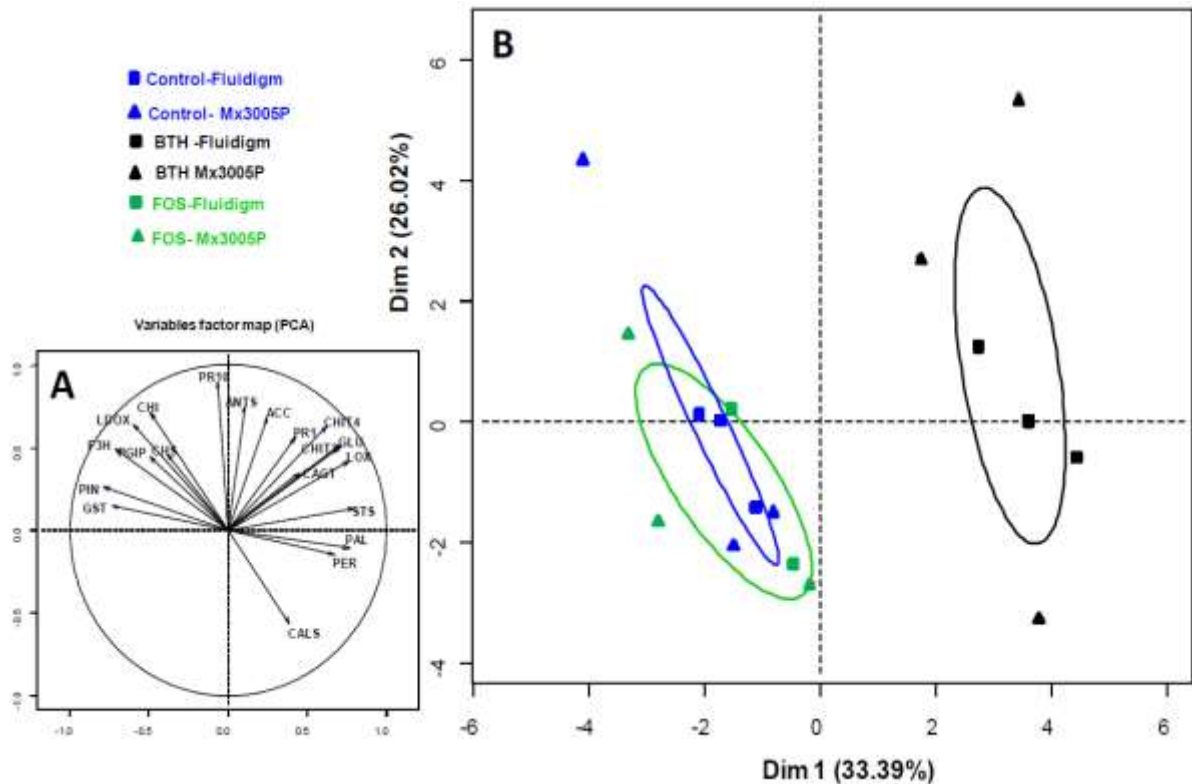


Figure 5 : Analyse en composantes principales et groupes de gènes différentiellement exprimés. Principal component analysis and clusters of genes differentially expressed.

Tableau 1 :

L'expression relative des gènes liés à la défense significativement induite (rouge) ou réprimée (bleu) dans les feuilles traitées avec BTH et FOS comparativement aux témoins non traités échantillonnés 48h après le deuxième traitement (S2) au seuil de 0,05%.

Relative expression of defense-related genes significantly induced (bold and italic) or repressed (italic and underlined) in leaves treated with BTH and FOS in comparison with untreated controls sampled 48h after the second treatment (S2) at the threshold of 0.05 %.

	BTH	FOS
<i>PR1 bis</i>	<i>7.37</i>	-
<i>PR2</i>	<i>3.31</i>	-
<i>PR7 bis</i>	<i>0.69</i>	<i>0.88</i>
<i>PAL</i>	<i>3.17</i>	<i>1.56</i>
<i>STS</i>	<i>2.11</i>	-
<i>LDOX</i>	<i>0.68</i>	-
<i>F3H</i>	<i>0.67</i>	-
<i>GST2</i>	-	<i>0.93</i>
<i>GST4</i>	-	<i>1.74</i>
<i>LOX9</i>	<i>1.75</i>	-
<i>EDS1b</i>	<i>3.36</i>	-
<i>JAR2</i>	<i>0.61</i>	<i>0.55</i>
<i>ACO1b</i>	<i>1.58</i>	-
<i>EIN3</i>	-	<i>0.73</i>
<i>EIN3bis</i>	<i>0.50</i>	<i>0.46</i>
% of differentiated genes	14.1	8.2
Relative % of up-regulated genes	58.3	25

CONCLUSION

Dans cet article, nous présentons le développement d'une nouvelle méthodologie q-PCR à haut débit adaptée pour évaluer les réponses de défense de la vigne. Avec le système Biomark HD, il est possible d'obtenir 9216 données (96 échantillons combinés avec 96 jeux d'amorces) en un seul run de 4 h. Cette nouvelle méthode flexible a un débit 60 à 70 fois plus élevé et utilise des quantités d'ADNc de 70 à 150 fois plus petites que les méthodes utilisées par le passé. En outre, les échantillons et les réactifs utilisés sont environ 6 fois moins chers qu'avec les méthodes classiques.

La puce "NeoViGen96" nous a permis de démontrer l'effet stimulateur des défenses de la vigne du BTH dans le vignoble, conduisant à une protection partielle mais significative contre le mildiou. Avec le FOS, la protection de la vigne obtenue contre le mildiou au vignoble ne pouvait pas être expliquée par une faible activité d'induction des défenses de la vigne, ce qui suggère qu'elle a une forte action fongicide dans nos conditions.

Il est maintenant possible d'obtenir une meilleure et plus facile compréhension des réponses de la vigne à l'élicitation, en conditions contrôlées pour sélectionner des SDP ou étudier le mode d'action des produits mais surtout sur le terrain pour évaluer le potentiel des éliciteurs en les combinant dans des programmes de lutte novateurs en association ou en alternance avec des fongicides conventionnels afin de réduire l'utilisation de fongicides.

En mettant d'importants efforts en bio-informatique, cet outil pourrait, par ailleurs, être transféré à d'autres espèces cultivées. Des travaux déjà réalisés sur le modèle *Arabidopsis thaliana* pourrait déjà servir à une application future sur le colza (*Brassica napus*).

REMERCIEMENTS

Nous remercions la plateforme Génomique de Toulouse (<http://get.genotoul.fr>) pour l'accès au système BioMark™ HD, à N. Ladouce (LRSV) pour son assistance technique, à L. Druelle pour l'assistance technique dans les expériences au vignoble, L. De Bastard de Syngenta pour la fourniture d'acibenzolar-S-méthyle, et au professeur R. Cooke pour la lecture du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- de Bernonville TD, Marolleau B, Staub J, Gaucher M, Brisset M-N: **Using Molecular Tools To Decipher the Complex World of Plant Resistance Inducers: An Apple Case Study.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, **62**(47):11403-11411
- Dufour MC, Lambert C, Bouscaut J, Merillon JM, Corio-Costet MF: **Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*.** *Plant Pathology* 2013, **62**(2):370-382.
- Dufour MC, Magnin N, Dumas B, Vergnes S and Corio-Costet MF: **High-throughput gene-expression quantification of grapevine defense responses in the field using Microfluidic Dynamic Arrays,** *BMC genomics* 2016, DOI: 10.1186/s12864-016-3304-z.
- Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research* 2001, **29**(9).
- Simko I, Piepho H-P: **The Area Under the Disease Progress Stairs: Calculation, Advantage, and Application.** *Phytopathology* 2012, **102**(4):381-389.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST: **An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development -.** *Bmc Plant Biology* 2006, **6**:27.