

Perspectives pour la viticulture du décryptage du génome de la vigne

Partie 2/3: Économiser les intrants

Revue des Oenologues, 2009, 130:9-11

A-F. Adam-Blondon¹, R. Bacilieri², F. Baillieux³, J-M. Boursiquot², C. Clément³, X. Daire⁴, F. Delmotte⁵, S. Delrot⁶, C. Dubreuil⁴, E. Duchêne⁷, A. Gauthier⁴, F. Karst⁷, T. Lacombe², V. Laucou², D. Merdinoglu⁷, P. Mestre⁷, N. Ollat⁶, F. Pelsy⁷, J-P. Péros², B. Poinssot⁴, A. Pugin⁴, P. Rey⁶, N. Terrier⁸, P. This², S. Trouvelot⁴, M. Viaud⁹

Comme nous l'avons souligné dans le premier article de cette série, le décryptage récent du génome de la vigne ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension du fonctionnement de la vigne dans son environnement et par conséquent pour travailler sur les caractères d'intérêt pour la viticulture et l'œnologie. Des rencontres ont donc été organisées entre chercheurs des organismes de recherche (Inra, Cnrs, universités), ingénieurs/chercheurs de l'Institut Français de la Vigne et

du Vin (recherche développement) et les membres des interprofessions pour dégager des projets nationaux, tout en veillant à une utilisation optimale de cet outil, lorsqu'elle est pertinente. Le Cniv s'est ainsi engagé à co-financer dans ce cadre une partie des projets soumis à l'agence nationale pour la recherche (ANR) à partir de 2008.

Les questions prioritaires posées par la profession sont les suivantes :

Comment réduire de 50 % la couverture en pesticides des vignobles et comment apporter des solutions aux problèmes encore non résolus comme les maladies du bois ou les viroses ?

Comment adapter les pratiques viticoles au réchauffement climatique et maîtriser les processus de maturation et la qualité de la vendange dans ce cadre ?

Comment mieux gérer et mieux utiliser les ressources génétiques vigne pour répondre aux deux premiers objectifs ?

Pour y répondre, les chercheurs doivent mettre en œuvre des approches de génétique (cartographie de QTL, génétique d'association...) et de génomique fonctionnelle (étude à haut débit du transcriptome, du protéome ou du métabolome d'un organe dans une condition particulière, étude à faible débit de la fonction d'un gène à travers des plantes portant des versions mutées non fonctionnelles du gène...) intégrées que nous avons brièvement décrites dans des numéros précédents de la Revue des Oenologues.

Une vigne saine et une viticulture économe en intrants

La vigne cultivée, *Vitis vinifera*, est sensible à de nombreuses maladies qui rendent nécessaire l'utilisation intensive de produits phytosanitaires au cours de sa culture. Or cela pose aujourd'hui des problèmes de respect de l'environnement, de santé du viticulteur et du consommateur, de résistance à certaines familles de fongicides et d'image des produits viticoles. C'est pourquoi les acteurs du « Grenelle de l'environnement » suggèrent une réduction drastique et rapide de l'utilisation des produits phytosanitaires. Par ailleurs, certaines maladies très préoccupantes au vignoble sont sans solution de traitement (Court noué, flavescence dorée, maladies du bois). En réponse aux agents pathogènes, les plantes ont la capacité d'activer des réactions de défense sophistiquées qui sont comparables au système immunitaire inné des mammifères et dont l'efficacité dépend de deux facteurs clés : la reconnaissance de l'agresseur par les produits des gènes de résistance et la rapidité de l'activation des défenses appropriées par une cascade de signalisation. En retour, la stratégie des agents pathogènes consiste à essayer de « passer sous les radars » des plantes et à contrer leurs réactions de défense.

Enfin, le développement des deux organismes est largement influencé par des facteurs de l'environnement biotique et abiotique. La connaissance du dialogue moléculaire complexe entre les deux organismes, en fonction de leur environnement, est donc cruciale pour proposer des solutions innovantes à la viticulture dans les dix prochaines années.

Étudier l'environnement biotique du cep

La vigne est environnée par une population dense et diversifiée de micro-organismes qui influence positivement ou négativement la croissance et la santé des ceps ainsi que la qualité du produit final, le vin. Jusqu'à présent, les études ont principalement porté sur les microorganismes pathogènes ou impliqués dans les déviations organoleptiques des moûts et des vins ou encore colonisateurs des grappes sous l'angle de leur devenir lors des étapes de vinification. Or une connaissance détaillée des populations microbiennes colonisant le sol des vignobles ainsi que le tronc, les feuilles et les grappes est d'importance, car celles-ci peuvent exercer un effet bénéfique direct sur la plante en participant par exemple à sa nutrition et à sa protection en régulant les populations des micro-organismes pathogènes à des niveaux ne leur permettant pas de devenir virulents. La possibilité de gérer la microflore de la vigne (écologie microbienne dirigée) doit donc être explorée. Le développement d'outils moléculaires (**encadré 1**) qui

¹ UMR INRA-CNRS-Université d'Evry « Génomique Végétale » - Evry - France.

² UMR INRA-MontpellierSupAgro-IRD-Université Montpellier II « Diversité des génomes et Adaptation des Plantes Cultivées » - Montpellier - France.

³ Université de Reims Champagne-Ardenne, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne EA2069, Laboratoire de stress, Défenses et Reproduction des Plantes - Reims - France.

⁴ UMR INRA 1088-CNRS 5184-Université de Bourgogne « Plante-Microbe-Environnement » - Dijon - France.

⁵ UMR INRA-ENITAB « Santé Végétale », Institut des Sciences de la Vigne et du Vin - Villenave d'Ornon France.

⁶ UMR INRA-ENITAB-Universités Bordeaux I et II « Ecophysiologie et Génomique fonctionnelle de la vigne », Institut des Sciences de la Vigne et du Vin Villenave d'Ornon - France.

⁷ UMR INRA-Université Louis Pasteur de Strasbourg « Santé de la vigne et qualité du vin » - Colmar - France.

⁸ UMR INRA-MontpellierSupAgro-Université Montpellier I « Sciences Pour l'œnologie » - Montpellier - France.

⁹ UMR INRA-AgroParisTech, « Biologie et Gestion des Risques en Agriculture Champignons Pathogènes des Plantes » - Versailles - France.

permettent de s'affranchir des limites de la culture d'isolats sur milieu spécifiques et de suivre les variations de micro-organismes au sein d'un écosystème apportera des informations capitales sur la composition et l'évolution des populations microbiennes. La connaissance de la séquence du génome de la vigne permettra en parallèle de déterminer les voies métaboliques induites ou réprimées dans le cep en présence de microflore potentiellement suppressives ou non.

Comprendre les mécanismes de stimulation des défenses naturelles de la vigne.

Une résistance partielle à des agents pathogènes multiples peut être observée après stimulation aussi bien par des organismes bénéfiques que par des molécules naturelles. Deux mécanismes, encore mal compris, peuvent être distingués : l'élicitation (**figure 1**) et la potentialisation (**figure 2**). Par ailleurs, si les essais de protection par potentialisation ou élicitation sont très reproductibles en laboratoire et en serre, le transfert de cette technologie sur le terrain n'est pas totalement acquis et suggère une forte interaction avec l'environnement. Des études comparatives du transcriptome de plantes sensibles potentialisées ou non, élicitées ou non et infectées ou non par des agents pathogènes, intégrant de nombreuses variables environnementales au niveau de la parcelle cultivée, devrait permettre de mieux comprendre le phénomène et de mieux l'exploiter.

Créer des nouvelles variétés de vigne durablement résistantes

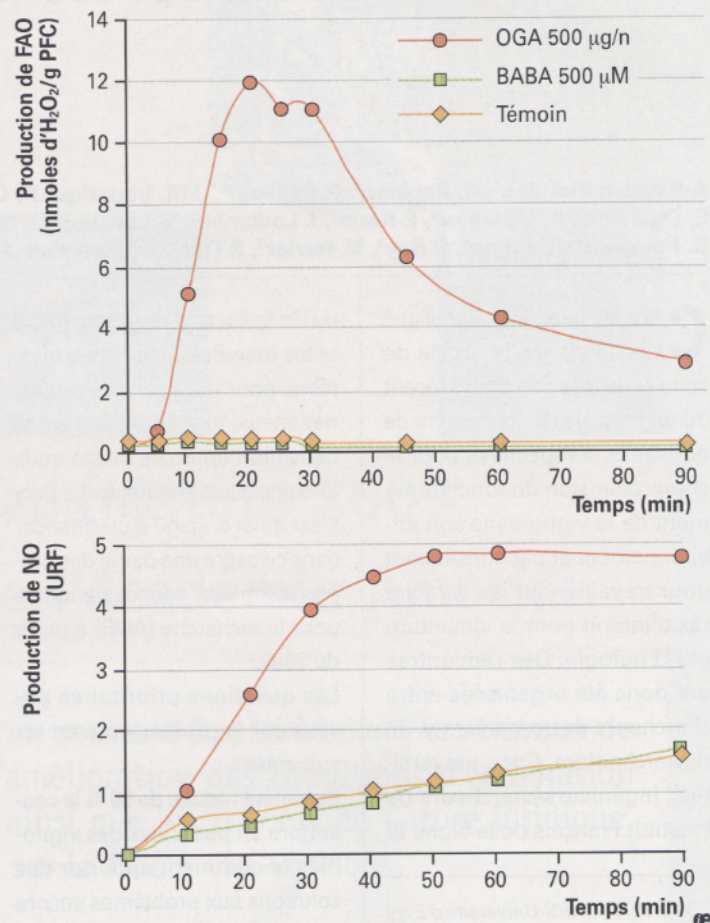
Dans l'espèce cultivée *Vitis vinifera*, on ne trouve pas de source de résistance aux principaux agents pathogènes responsables des traitements phytosanitaires au vignoble. Or, de nombreuses sources de résistance existent dans les espèces sauvages du genre *Vitis* d'origine américaine et asiatique. La sélection classique est alors utilisée pour introduire des gènes de résistance à partir d'une espèce sauvage, dans le fond génétique « cultivé », possédant toutes les caractéristiques agronomiques désirables, pour obtenir *in fine* une variété de haute valeur agronomique et technologique et résistante aux maladies. Ceci demande de nombreuses générations de croisements et les améliorateurs fondent donc beaucoup d'espoir sur la sélection assistée par marqueurs, qui leur permette de suivre au stade plantule les gènes d'intérêt au cours des générations de sélection, et ainsi, de diminuer le nombre final de générations nécessaires à la production d'une variété de qualité.

Dans ce contexte, la connaissance du génome de la vigne facilite grandement la mise au point de marqueurs génétiques robustes et utilisables chez plusieurs espèces du genre *Vitis* nécessaires pour identifier les gènes impliqués dans la résistance. À terme, ces avancées permettront de proposer plus rapidement des variétés qui combinent différents mécanismes de résistance et donc potentiellement plus durables (une parcelle de vigne est en général destinée à être plantée pour au moins trente ans).

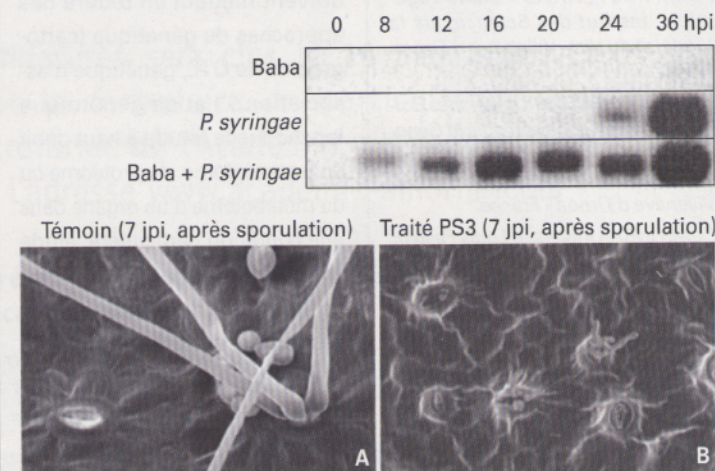
Comprendre le fonctionnement des agents pathogènes en interaction avec leur hôte

Le développement d'outils génomiques pour étudier la réponse des agents pathogènes face aux nouvelles variétés de vigne est également un enjeu majeur, pour garantir la durabilité des résistances utilisées. Il est par exemple nécessaire d'évaluer la diversité génétique et le potentiel évolutif des populations de pathogènes susceptibles de sur-

■ **Figure 1 : Après élicitation, une plante exprime un niveau de défense supérieur à la normale, même en l'absence d'un agent pathogène.** En revanche, la potentialisation n'a aucun effet détectable en l'absence d'agent pathogène. **A** : production de formes actives de l'oxygène (FAO) et **B** de monoxyde d'azote (NO) en réponse à un éliciteur (oligogalacturonates: OGA) ou à un potentialisateur (acide beta-amino butyrique: BABA) sur cellules de vigne non infectées.



■ **Figure 2 : Après potentialisation, les réactions de défense de la plante sont induites uniquement lors du contact avec l'agresseur et on observe alors une transcription plus rapide et plus intense de gènes de défense après infection et une résistance induite.** **A**. Mise en évidence de l'effet potentialisateur du Baba sur l'accumulation d'ARNm du gène de défense PR-1 après infection (heure post-inoculation: hpi) par *P. syringae* chez *A. thaliana* (Zimmerli et al., 2000); **B**. Sur vigne, la potentialisation induite par PS3 bloque la sporulation du mildiou 7 jours après l'inoculation (Trouvelot et al., 2008). **A**: feuille témoin montrant l'émergence de sporangiophores à partir d'un stomate; **B**: feuille préalablement traitée par le potentialisateur PS3 montrant la présence de sporangiophores avortés (flèche) qui ne produisent plus de sporanges.



Expression précoce du gène de défense PR-1 dans une plante potentialisée.

monter ces résistances, ce qui nécessite la mise au point de marqueurs moléculaires chez l'agent pathogène. Par ailleurs, l'accès conjoint au génome complet de la vigne et d'un de ses agents pathogènes permet de suivre simultanément et sans *a priori* l'expression des gènes des deux organismes au cours du processus d'infection et ainsi d'identifier des gènes clefs, tant au niveau des mécanismes d'infection fongiques, qu'au niveau de la mise en place des réactions de défense. Ainsi, le génome de *Botrytis cinerea* (40 millions de bases), agent des pourritures grise et noble, a été séquencé en 2006 au Génoscope et annoté à l'Inra (15000 gènes environ). Ce champignon a été choisi dans un premier temps car il constitue une espèce modèle dans l'étude du processus infectieux des cham-

pignons phytopathogènes (**figure 3**). Des outils génomiques doivent maintenant également être développés pour les autres agresseurs majeurs de la vigne, en dépit d'une plus grande difficulté à les manipuler pour la majorité d'entre eux. En particulier, ils ne sont souvent pas cultivables sur milieu artificiel, ce qui demande de mettre au point des protocoles spécifiques pour obtenir des préparations d'ADN/ARN pures. Mais la connaissance de la séquence du génome de la vigne permet maintenant de trier les résultats *a posteriori* en cas de « contamination » de l'ADN/ARN de l'agresseur par celui de la vigne. La combinaison de l'ensemble de ces approches devrait permettre de proposer de nouvelles méthodes de lutte basées sur (i) le développement de marqueurs d'infection qui constitue-

ront des outils d'aide à la décision dans le cadre d'une lutte chimique réduite, (ii) des pratiques culturales permettant la stimulation des réactions de défense de la vigne, pourquoi pas, (iii) la recherche de nouvelles molécules fongicides plus spécifiques des bioagresseurs et donc permettant des applications réduites et (iv) l'utilisation à terme de nouvelles variétés de vigne durablement résistantes. ■

NDLR: La troisième partie de cette étude « Maîtrise de la maturation et gestion des ressources génétique de la vigne » sera publiée dans le prochain numéro de la Revue des *Enologues* n° 131 (avril 2009).

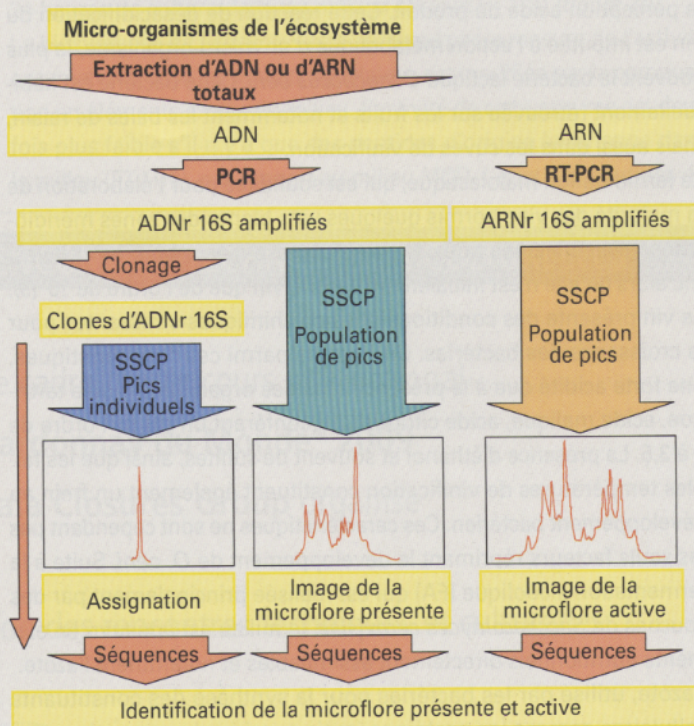
■ **Figure 3: *Botrytis cinerea* est aisément cultivable sur des milieux synthétique et les outils de génétique classique (croisements) et moléculaire (mutants d'inactivation de gènes) ont été développés pour caractériser les déterminants du mécanisme infectieux.**

A. Baies infectées en Champagne (Photo AS Walker Inra, Versailles). Le champignon *Botrytis cinerea* ayant plus de 200 plantes hôtes, des tests de virulence *in vitro* existent sur différentes plantes et organes. **B.** Baies inoculées avec des spores de *Botrytis*. **C.** Feuilles de haricot inoculées avec des implants de mycélium de souches sauvages pathogènes et de mutants dont on a inactivé les gènes de biosynthèse de la toxine Botrydial. Le défaut de colonisation des tissus végétaux observés chez les mutants démontre l'importance du Botrydial dans le cycle infectieux du champignon.



■ **Encadré 1: Micro-organismes de l'écosystème.**

L'étude des populations de micro-organismes passe maintenant par l'utilisation de méthodes moléculaires telles que le *fingerprint* ou des approches de métagénomique. Dans les deux cas, la population microbienne est prélevée en mélange et l'ADN du mélange est extrait. Dans la méthode de *fingerprint*, des gènes très conservés au sein des organismes vivants (Ex: ADNr 16S) avec cependant des variations de séquences suivant les organismes dont ils proviennent sont amplifiés à l'aide d'amorces universelles. Les différentes séquences alors obtenues en mélange peuvent être révélées par différentes méthodes dont la SSCP ou le séquençage. La métagénomique est une extension de la méthode qui consiste à fragmenter l'ADN extrait et à tout séquencer, donnant ainsi accès à des fragments de séquences de l'ensemble du génome des organismes en présence. Enfin, les ARN peuvent être extraits au lieu des ADN. Le *fingerprint* de ces ARN permettra de recenser les organismes actifs dans l'échantillon et une approche de type métagénomique donnera en plus des informations sur les gènes stimulés chez ces organismes et les métabolismes en cours.





SOBEMAB

Embouteilleur à façon
Propriété - Centre fixe
Logistique

BP 1 - 71570 CHÂNES
Tél. 03 85 36 58 00 - Fax 03 85 37 18 56 - E-mail : sobemab@wanadoo.fr





graphisme: catharina.comblair photo: jean-yves.chalutier