

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Ecole Doctorale des Sciences Exactes et Leurs Applications ED211

Spécialité

Physiologie-Biologie

Relations entre l'oomycète, *Pythium oligandrum*, et la vigne :
étude de l'induction de résistance contre un agent pathogène
du bois et impact sur les communautés microbiennes
colonisant la plante

Présentée et soutenue le 14 décembre 2015
par

Amira YACOUB

MEMBRES DU JURY

Marc BARDIN, Chargé de Recherche-HDR INRA Avignon	Rapporteur
Emile BENIZRI, Professeur Université de Lorraine	Examineur
Christophe BERTSCH, Professeur Université de Haute Alsace	Rapporteur
Stéphane COMPANT, Maître de Conférences AIT, Autriche	Examineur
Florence FONTAINE, Maître de Conférences-HDR Univ.de Reims et Champagne-Ardenne	Examinatrice
Rémy GUYONEAUD, Professeur Université de Pau et des Pays de l'Adour	Co-directeur
Patrice REY, Professeur Bordeaux Sciences Agro	Co-directeur

Relations entre l'oomycète, *Pythium oligandrum*, et la vigne : étude de l'induction de résistance contre un agent pathogène du bois et impact sur les communautés microbiennes colonisant la plante

Il est actuellement estimé qu'environ 13% du vignoble français est improductif suite aux pathologies affectant le bois des ceps, la principale d'entre elles étant l'esca. Parmi les moyens de lutte mis en œuvre, le biocontrôle, via l'utilisation d'un oomycète, *Pythium oligandrum*, est actuellement développé pour protéger les plants de vigne contre un agent pathogène pionnier de l'esca, *Phaeoconiella chlamydospora*.

La sélection de souches de *P. oligandrum*, isolées du vignoble, et produisant *in vitro* des quantités importantes d'une protéine élicitrice, l'oligandrine, des systèmes de défense des végétaux a d'abord été réalisée. Trois essais en serre ont montré qu'une réduction significative (40 à 50%) des nécroses dues *P. chlamydospora* était observée après application d'inocula de l'oomycète sur les racines des plants de vigne pied-francs. Au niveau de la tige, le niveau d'expression de 22 gènes impliqués dans les mécanismes de défenses de *Vitis vinifera* a été mesuré par PCR quantitative et des réponses spécifiques du végétal ont été observées selon les traitements. Six gènes (protéines PR, voie des phénylpropanoïdes, oxylipines et le système d'oxydo-réduction) ont été fortement induits lorsque les plants ont été pré-inoculés par *P. oligandrum* puis infectés par *P. chlamydospora*.

Afin de mettre en évidence les mécanismes spécifiques mis en place lors de cette interaction tripartite, l'analyse de la réponse transcriptomique globale de la vigne (par microarray et RNAseq), au niveau de la tige, a été réalisée chez ces plants qui manifestent une résistance induite systémique (ISR). Plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène et des jasmonates sont fortement induits, chez les plants pré-traités par l'oomycète puis infectés par l'agent pathogène. Plusieurs facteurs de transcription régulant ces voies de signalisation sont également fortement induits. Suite à l'analyse des populations de messagers (mRNA) de *P. chlamydospora*, il a été observé que les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires, des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de différentes voies chez les champignons et certaines Carbohydrates Actives enZymes étaient modulés en présence de *P. oligandrum* au niveau racinaire. Ces résultats montrent que la colonisation du végétal par l'oomycète, même à distance de *P. chlamydospora*, induit un stress indirect important chez celui-ci.

Afin d'optimiser l'implantation de cet agent de biocontrôle en pépinière et au vignoble, l'aptitude de *P. oligandrum* à coloniser les racines de plants de vignes greffés et à les protéger contre *P. chlamydospora* a été étudiée. Trois portes-greffes (SO4, 3309 et 101-14) greffés sur des cépages (Cabernet Sauvignon et Sauvignon Blanc) ont été inoculés ou non par *P. oligandrum*. L'oomycète s'implantait sur les différents systèmes racinaires, mais en proportion variable selon les associations cépage/porte-greffe utilisées. Les analyses par empreintes moléculaires (Single Strand Conformation Polymorphism) ont montré que des microflores fongiques et bactériennes complexes et diversifiées colonisaient les feuilles et les racines, mais que l'introduction de *P. oligandrum* sur la plante n'induisait pas de bouleversements directs ou indirects notables au niveau de ces microflores indigènes. Une protection des jeunes plants de vigne greffés (SO4 + Cabernet Sauvignon) semble être induite par *P. oligandrum* contre l'agent pathogène, *P. chlamydospora*.

Mots clés: biocontrôle, *P. oligandrum*, esca, maladie du bois, *P. chlamydospora*, résistance systémique induite, plants greffés

Relationships between the oomycete, *Pythium oligandrum*, and grapevines: induced resistance against a trunk wood pathogen and impact on plant microbial communities

Approximately 13% of French vineyards are currently considered unproductive due to trunk diseases, mainly Esca, a particularly destructive disease that affects grapevines worldwide. Accordingly, biological control of a pathogen implicated in Esca, *Phaeomoniella chlamydospora*, was developed using the oomycete, *Pythium oligandrum*.

The selection of *P. oligandrum* strains, isolated from vineyards, which produced *in vitro* large quantities of oligandrin, an elicitor-like protein inducing plant defences, was carried out. Three greenhouse assays showed that the necroses caused by *P. chlamydospora* were significantly reduced (40 to 50%) when *P. oligandrum* colonized the root system of vine cuttings. At stem level, the expression of a set of 22 genes involved in *Vitis vinifera* defence mechanisms was measured by quantitative PCR. Depending on the treatments employed, significant differences in grapevine responses were observed. Six of the genes (PR proteins, phenyl-propanoid pathway, oxylipins and the oxydo-reduction system) were strongly induced in plants pre-treated with *P. oligandrum*, and subsequently infected by *P. chlamydospora*.

In order to characterize the mechanisms occurring during this tri-partite interaction, the global transcriptomic grapevine responses at stem level were analysed, using microarray and RNAseq, in plants in which induced systemic resistance (ISR) had taken place. Several genes involved in ethylene and jasmonate biosynthesis were strongly induced in plants that were pre-treated with *P. oligandrum*, and subsequently infected by *P. chlamydospora*. The transcription factors involved in the regulation of these signalisation pathways were also induced. Analysis of the *P. chlamydospora* RNA messenger (mRNA), showed that certain genes involved in secondary metabolite synthesis, transcription factors implicated in pathway regulations, and certain Carbohydrate Active enZymes, were modulated, when *P. oligandrum* colonised the roots. These results demonstrated that root inoculation with *P. oligandrum* induced indirect stress on *P. chlamydospora* responses.

In order to promote *P. oligandrum* implantation in nurseries and vineyards, the capacity of this biocontrol agent to colonize the roots of grafted-plants, and to protect them against *P. chlamydospora* attacks, was studied. Three rootstocks (SO4, 3309 and 101-14), grafted on two scion varieties (Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc), were inoculated or not with *P. oligandrum*. Depending on the particular scion/rootstock associations, the oomycete colonized the various root systems differently. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analyses revealed complex and diverse fungal and bacterial communities in both the rhizosphere and the phyllosphere. These microflora, which were organ-dependent, were not directly or indirectly affected by the root inoculation of *P. oligandrum*. Protection of grafted vines (SO4 + Cabernet Sauvignon) was probably induced by *P. oligandrum* against the pathogen, *P. chlamydospora*.

Keywords: biocontrol, *P. oligandrum*, esca, grapevine trunk diseases, *P. chlamydospora*, induced systemic resistance, grafted plants