

# Etat sanitaire du matériel végétal : quelles perspectives ?

Géraldine Uriel<sup>1</sup> & Olivier Lemaire<sup>2</sup>



1



2



Dans un cep, **le virome** est sa « *carte d'identité* » et induit des interactions biologiques très complexes avec la vigne :

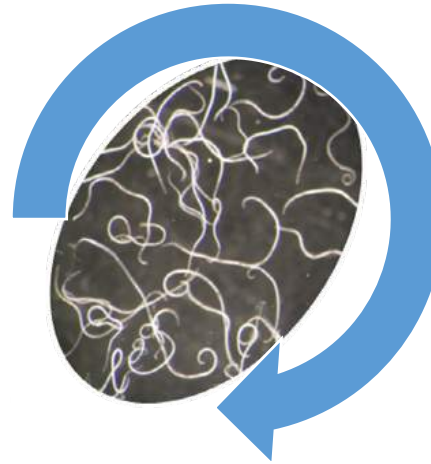
- Des **interactions cellulaires et moléculaires très complexes** et très peu étudiées ; exclusion, synergie, latence ... études étiologiques difficiles
- Des **ré-inoculations permanentes** (nématodes, cochenilles, thrips ...)
- Une **distribution** intra-pied, spatiale et saisonnière très hétérogène
- Avec **l'évolution climatique**, les aires de répartitions des vecteurs changent
- Avec **les HTS**, notion de **virome** ou microbiote viral – virus pathogènes, commensaux, **bénéfiques** ?
- Ce virome semble être **unique** pour un pied de vigne, même pour 2 pieds contigus... en lien avec son histoire ... **traçabilité**
- La notion de **virus bénéfiques** appelle l'exploration de leur intérêt dans le biocontrôle des viroses graves de la vigne

# Le court-noué : un pathosystème complexe ...

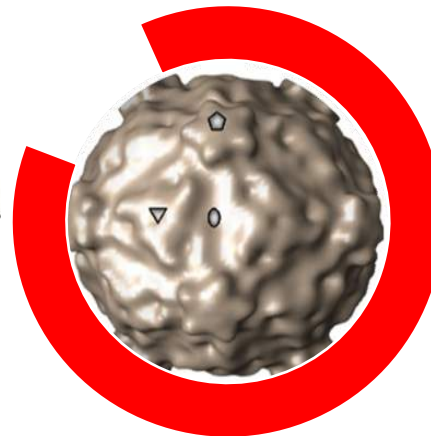
Une plante  
hôte, la **VIGNE**



Des **nématodes**  
vecteurs



Deux virus  
principaux,  
**ArMV & GFLV**





# Une maladie en progression ...



*Vignoble de Cramant (Marne)*

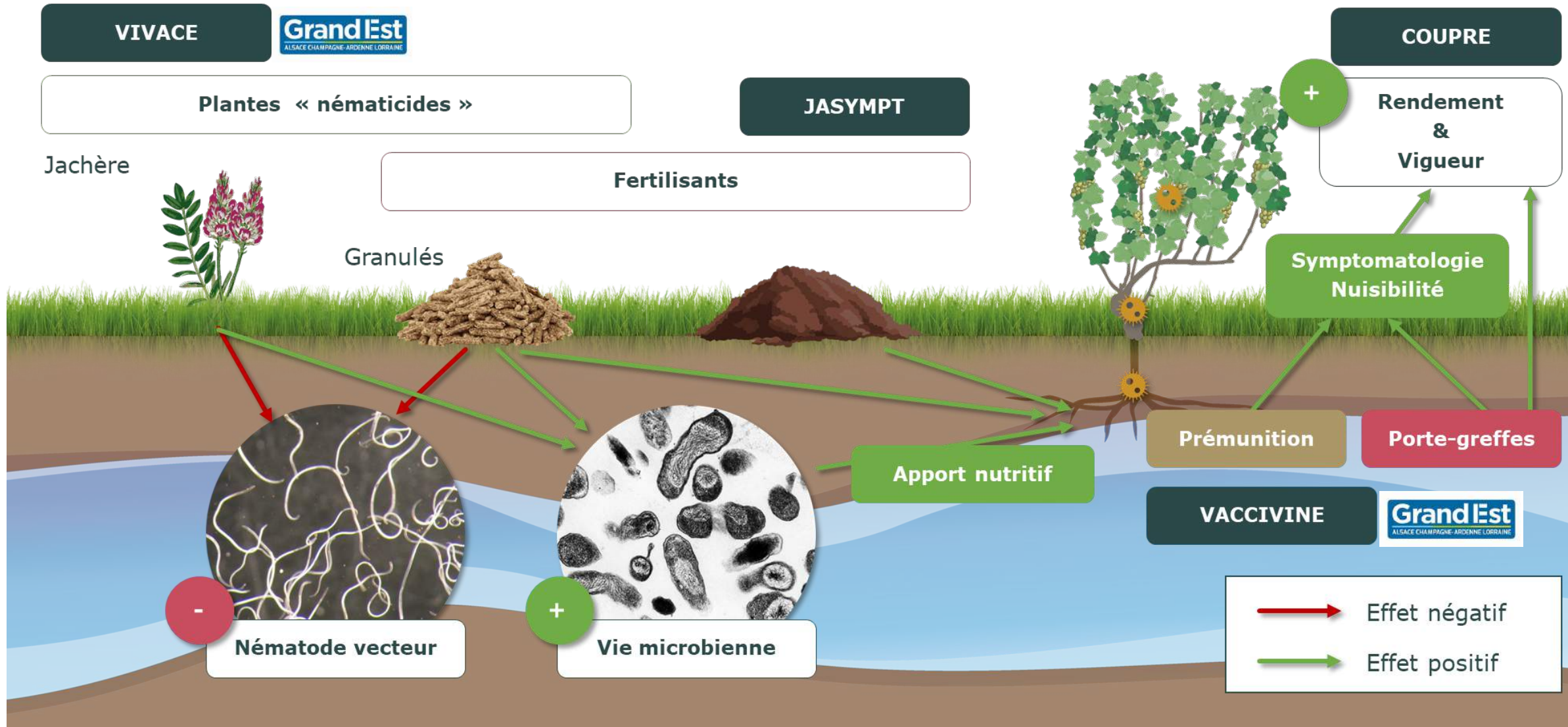
**Secteurs historiques très touchés ...**

Des pertes de récolte conséquentes ...

**Progression lente mais constante ...**

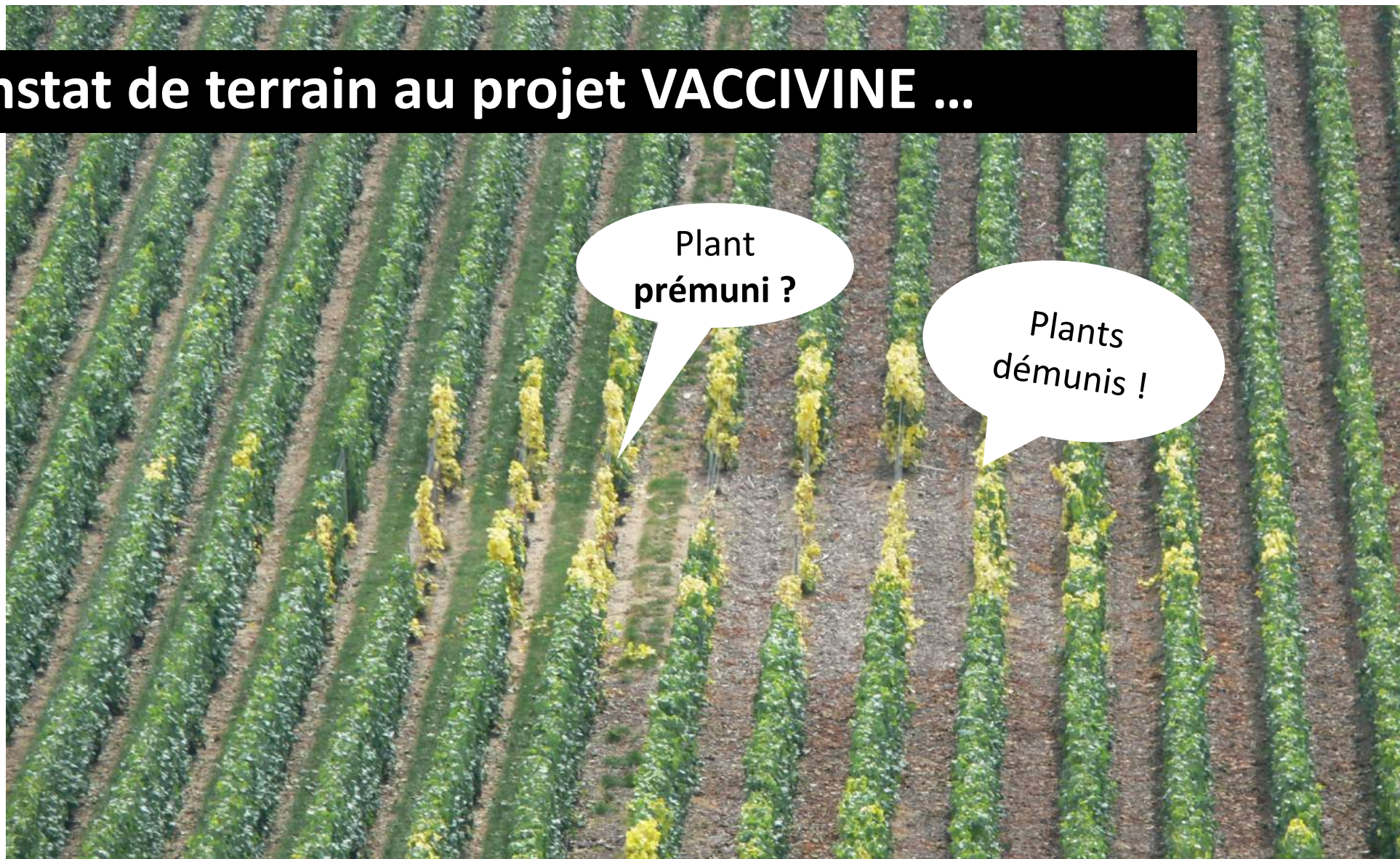
Pratique d'arrachage précédée de la dévitalisation – replantation en 18 mois souvent décevante ...

# Pas UNE mais DES stratégies de lutte ...





## Du constat de terrain au projet VACCIVINE ...





## Du constat de terrain au projet VACCIVINE ...



Essai prémunit, Cramant (Champagne)



Essai prémunit, Chablis

Des résultats encourageants dans un vignoble ...

Mais peu concluants dans un autre ...

Pourquoi ?

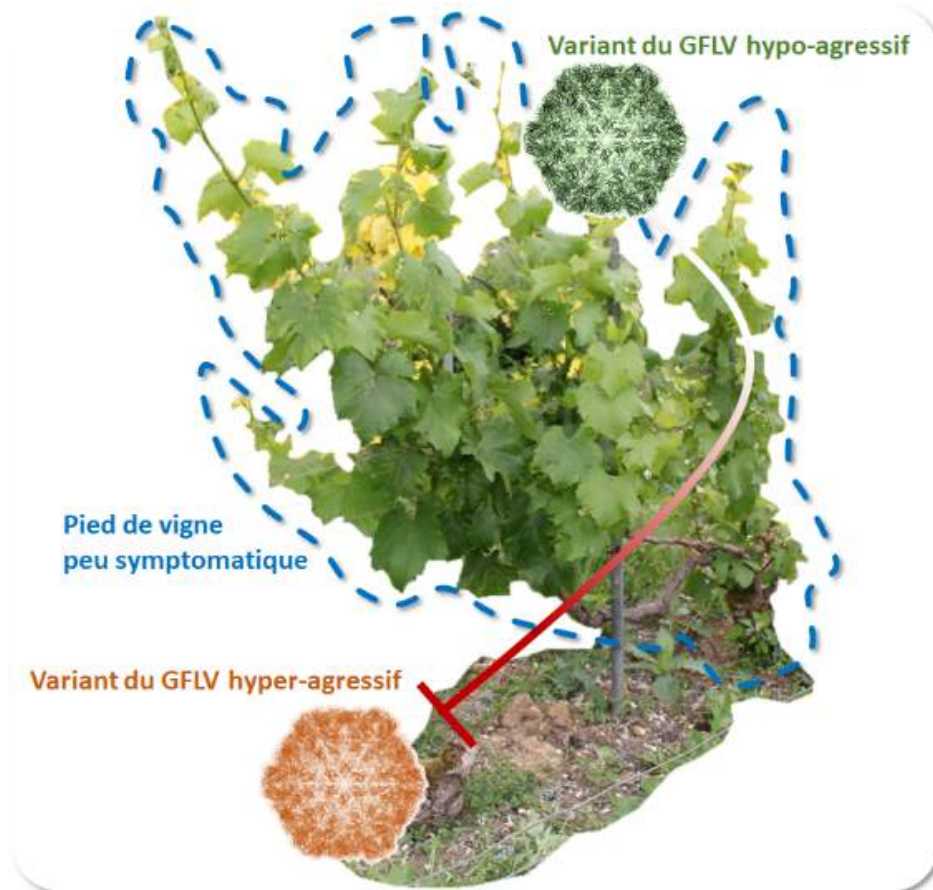
Effet dû au couple greffon – porte-greffe, lié aux pratiques culturales, aux variants viraux ... ?

# Qu'est-ce que la prémunition ?

## PRINCIPE DE LA PRÉMUNITION

Exploration de la prémunition comme méthode de **biocontrôle** pour atténuer **durablement** l'impact du court-noué : **exploitation de données phénotypiques** au vignoble

État de **résistance induite** à toute **surinfection** d'un organisme primo- infecté par un **virus « hypo-agressif »**







2018-2021

- INRA Colmar
- CIVC
- CA89
- CA84
- IFV
- CNRS Strasbourg
- Moët & Chandon
- BIVB
- CIVA

1995 : Bennwhir

2003 : Châteauneuf-du-Pape

2006 : Chablis

2009 : Cramant

+ parcelles vignobles (~20)

## Projet Vaccivine : voir poster Emmanuelle Vigne

### LES OBJECTIFS

- Déterminer le **niveau de protection conférée** par les variants viraux naturels *prémunisants* et leur impact agronomique
- Identifier de **nouveaux variants viraux hypo-agressifs** adaptés aux terroirs
- **Caractériser la diversité génétique** des populations de GFLV au vignoble à l'aide des **nouvelles technologies de séquençage : HTS**

## Projet Vaccivine :

### LES CRITÈRES IMPORTANTS POUR UNE *PRÉMUNITION* EFFICACE ET DURABLE

1. Des symptômes plus faibles que ceux induits par les souches sévères
2. Souche virale capable d'induire une infection systémique
3. Souche virale stable génétiquement
4. Souche virale capable de protéger contre un large spectre de variants du même virus
5. Absence d'interaction négative avec d'autres virus qui pourraient être présents dans la plante
6. Facile à propager et à conserver
7. Le mécanisme d'action de la souche prémunisante est essentiel pour étudier la durabilité de la protection

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE GFLV ?

TECHNOLOGIES HTS

Ziebell & MacDiarmid. Prospects for engineering and improvement of cross-protective virus strains. Current Opinion in Virology (2017)



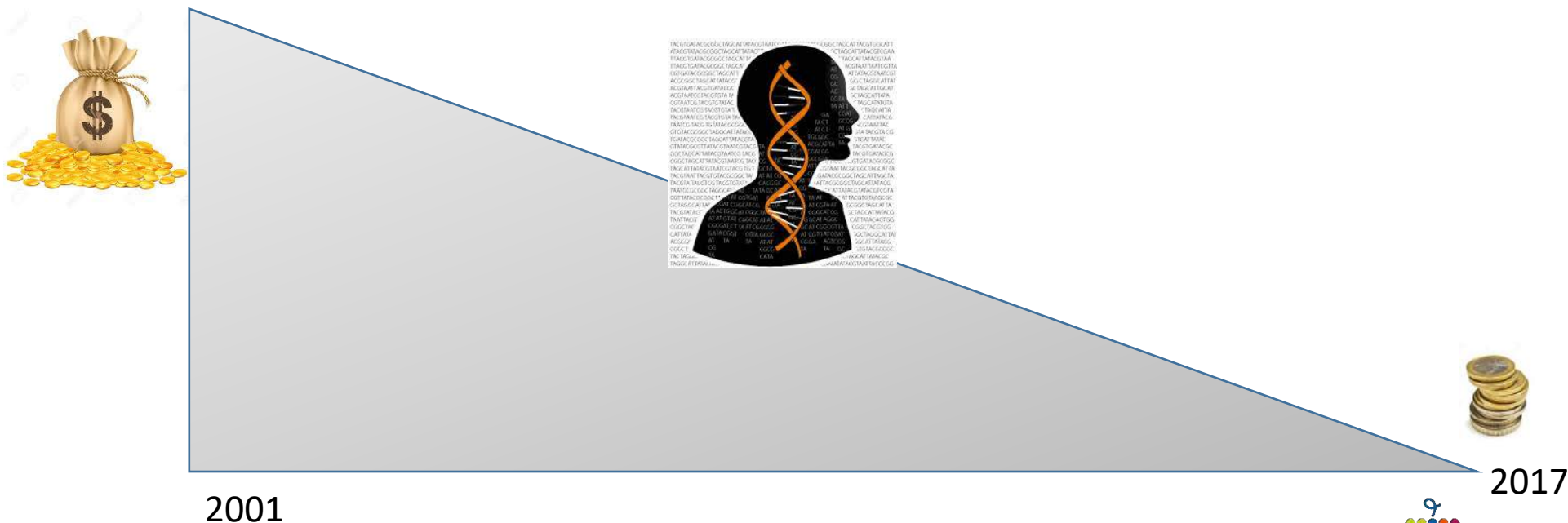


# Les technologies HTS

## LES TECHNIQUES HTS (HIGH THROUGHPUT SEQUENCING)

Nouvelles méthodes de **séquençage haut débit** (méthodologies apparues à partir de 2005) :

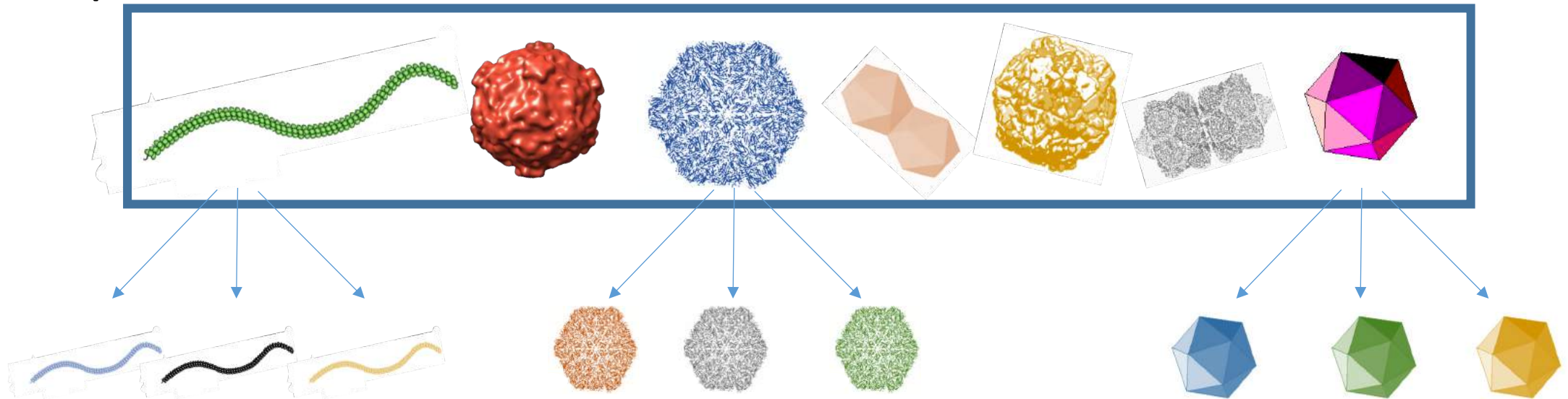
- Obtention de **millions** de courtes séquences ou « **reads** » en un seul « **run** »
- **Diminution drastique des coûts** (séquence complète du génome humain : 2001 ~ 100M\$ ; 2017 ~1k\$)
- Outils de **bioinformatique** et de **biostatistique** de plus en plus performants ; **bio-analyses complexes** et très **chronophages** et appropriation de **nouvelles compétences** dans le domaine des pathogènes de la Vigne



# Adaptation des HTS aux virus de vigne

Plus de 80 espèces virales détectées chez la vigne, dont plus d'une **vingtaine depuis 2011** avec l'utilisation des **HTS**

- **Multiplicité des génomes des espèces virales** : virus ARN (+, -), poly(A), non poly(A), sb et db, sb et db ADN, ADN circulaires, viroïdes ...
- **Quasi-espèces et variants viraux – infections mixtes**

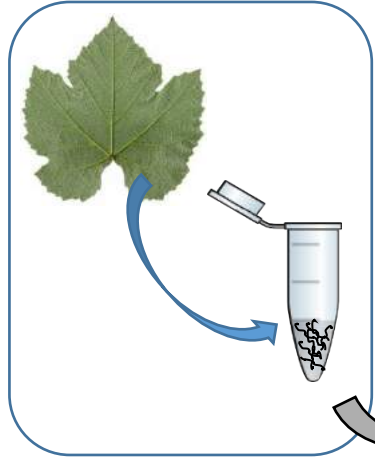


- **Virome, virus environnementaux** (ex myco-, entomo-, némato-virus) **et non encore identifiés**

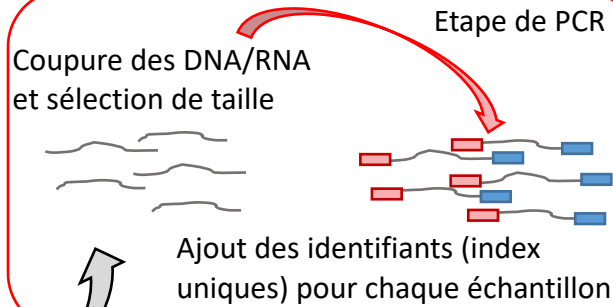


# Adaptation des HTS aux virus de vigne

## Préparation de l'échantillon Préparation de la librairie



Contrôle Qualité



Multiplexing

**Profondeur de séquençage**

## Plateforme de séquençage sous-traitance obligatoire



Choix de la plateforme de séquençage:  
454, Illumina, Solid, Ion torrent, Pac Bio,  
Oxford Nanopore

## Analyses bio-informatiques

**Bio-analyse des millions  
de « reads » générés**

**Choix des outils d'analyse :**

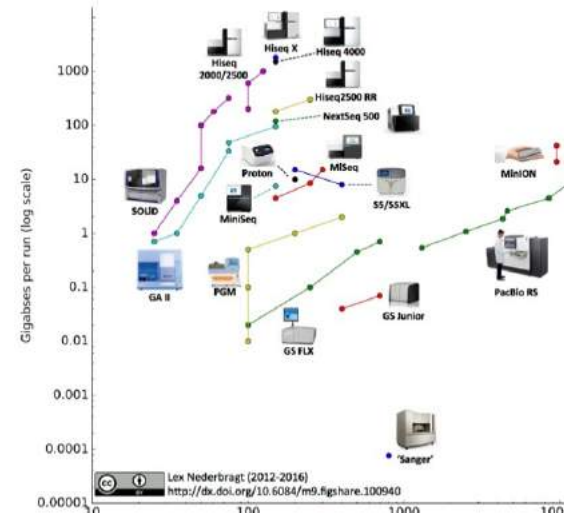
**-Paramétrages de détection ou  
reconstruction de génome  
entier**

**-Analyses populationnelles,  
spatiales et évolutives**

**-Bio-statistiques**

Choix dans :

- **L'échantillonnage** (type de tissu, période de l'année...)
- **Méthodologies d'extraction** des acides nucléiques – fonction de la question posée – veille technique



# Les HTS et le génome complet du GFLV

Génome du GFLV :  
2 molécules d'ARN



**HTS = accès à toutes les séquences présentes dans un échantillon (virus, bactéries, génome de l'hôte ....) : Holobionte « Vigne »**  
→ infections virales mixtes



Diversité génétique des populations de GFLV sur l'ensemble du génome

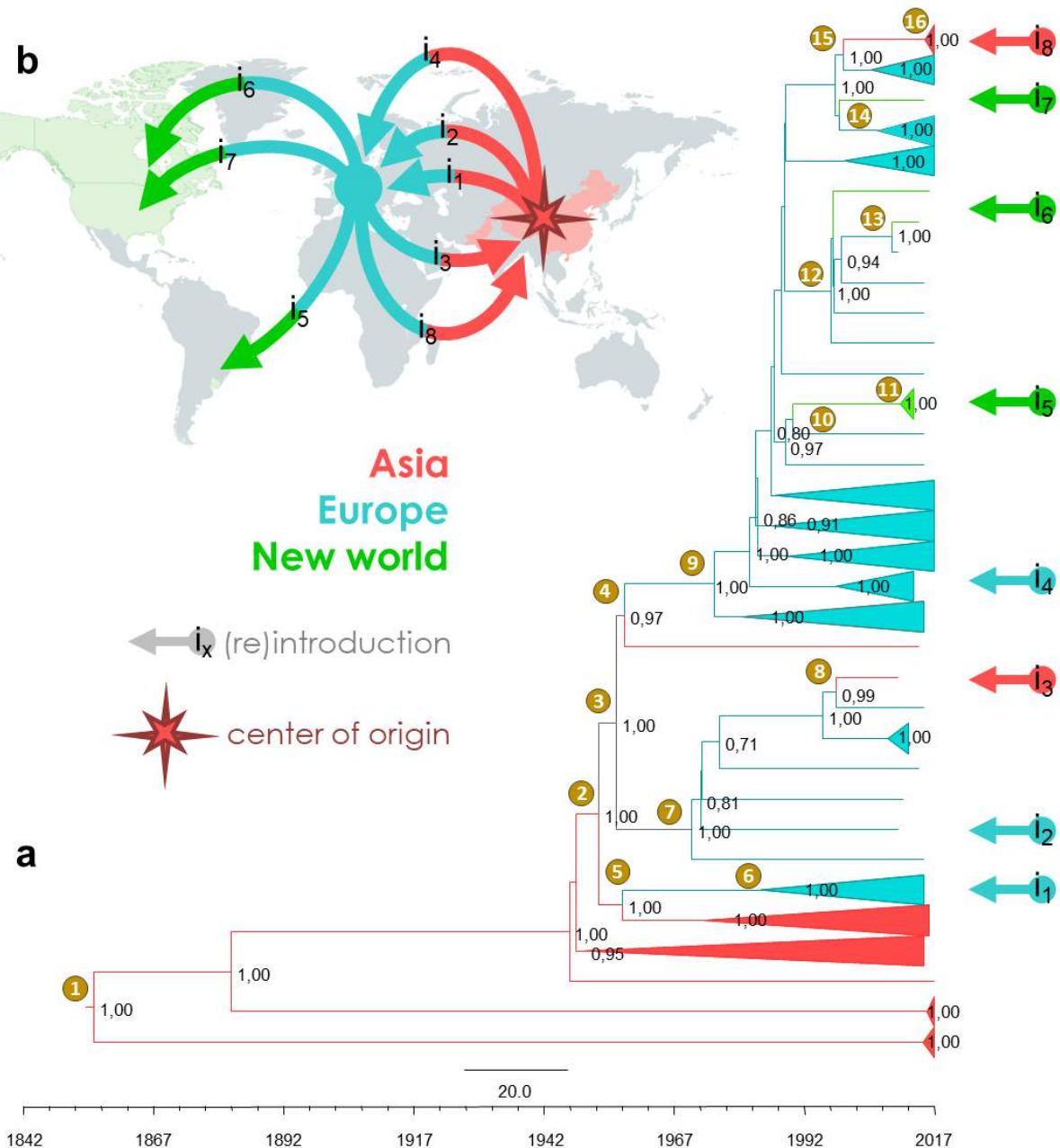
*Vigne et al., Frontiers in microbiology (2018)*

## Premiers résultats Vaccivine (100 isolats caractérisés)

- Un pied de vigne = **Plusieurs variants** de GFLV
- Environ **250 séquences de génome complets** de GFLV (contre **10** séquences auparavant disponibles dans les banques de données internationales)







# Les HTS sont primordiaux pour l'étude de l'évolution des virus de vigne et l'épidémio-surveillance

**Datamining** et épidémio-surveillance *in silico* :  
exploitation BDD mondiales (fichiers SRA libres de  
droit) : analyses phylo-géographiques du GPGV

**Première** histoire évolutive mondiale d'un virus de  
plante, le GPGV

Hily et al., *Phytophthora Journal* (2019)

**Collaborations :**  
*IFV, Jean-Michel HILY*  
*IRD Montpellier, Nils POULICARD*





# De VACCIVINE aux applications terrain ...

Des plants prémunis pour chaque vignoble ?

Evolution de la certification des plants ?

# Evolution possible du schéma de certification pour la filière vigne

LES **HTS** COUPLÉES AUX :

- ELISA (CONVENTIONNELS ET NANOBOBIES® ...)
- RT-PCR, PCR, Q-PCR ...
- INDEXAGE BIOLOGIQUE

Cas particulier de la **prémunition** : **labellisation des plants prémunis**

- **Certifier la présence de variants** de GFLV protecteurs et adaptés aux terroirs « *court-noués* »
- Certifier l'absence **d'autres virus indésirables**
- **Protocole** pour l'utilisation des plants prémunis

**Certification sanitaire des plants de vigne**

- **Réseau national** de vignes indemnes des virus/variants, réglementés nationalement, à l'import ou à l'export
- Certifier l'absence de **virus indésirables** (cas de l'export)
- Définition **de critères** pour décider si des virus ou des variants viraux sont indésirables (**ICVG**)
- **Traçabilité** en lien avec le virome endogène

**Vers la production de données HTS pour le matériel initial ? Vers une substitution de l'indexage biologique par les HTS (méthodologies de détection sans *a priori*) ?**



# Vers la sécurisation du matériel végétal et l'épidémio-surveillance au vignoble et *in silico*

- Intégrer les **approches HTS** dans la **détection des virus & viroïdes** et l'implémenter à terme dans **la certification**, au moins pour le matériel initial (**conservatoires dédiés**, *nematodes-insect-, mite proof* ...)
- Appropriation et **pérennisation** de ces compétences par la filière. **Laboratoire dédié aux HTS pour la certification**, les prestations de service et l'épidémio-surveillance au vignoble ?
- **Datamining** et **épidémio-surveillance in silico** ?
- Définir les **seuils de nuisibilité des viroses et leurs impacts socio-économiques**
- Les études sur le « **virome** » de la vigne se heurtent à des questions récurrentes et essentielles d'**étiologie et d'interactions entre virus**, et doivent prendre en compte le concept **d'holobionte « Vigne »**, d'où peuvent découler des **stratégies de lutte innovantes**
- ...

# Merci pour votre attention !

Géraldine Uriel<sup>1</sup> & Olivier Lemaire<sup>2</sup>

