

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**  
**Ecole Doctorale n°358 : Sciences, Technologie, Santé**

**THESE**

Présentée à l'UFR des Sciences Exactes et Naturelles  
Le 26 novembre 2010

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne**  
**Spécialité Biologie et Physiologie Végétales**

Par **Sophie BORDIEC**

**Interaction entre la vigne (*Vitis vinifera* L.) et une bactérie PGPR,  
*Burkholderia phytofirmans* souche PsJN : mécanismes de défense impliqués  
lors de la perception de la bactérie par la plante, et lors de l'établissement  
de la protection contre le froid et la pourriture grise.**



**Membres du Jury**

Pr M. Ongena	Université de Gembloux, Belgique	Rapporteur
Pr P. Rey	ENITAB-INRA Bordeaux, France	Rapporteur
Pr C. Clément	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Examineur
Pr M. Höfte	Université de Gent, Belgique	Examineur
Dr E. Ait Barka	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Co-directeur
Dr S. Dhondt-Cordelier	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Co-directeur







**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**  
**Ecole Doctorale n°358 : Sciences, Technologie, Santé**

**THESE**

Présentée à l'UFR des Sciences Exactes et Naturelles  
Le 26 novembre 2010

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne**  
**Spécialité Biologie et Physiologie Végétales**

Par **Sophie BORDIEC**

**Interaction entre la vigne (*Vitis vinifera* L.) et une bactérie PGPR,  
*Burkholderia phytofirmans* souche PsJN : mécanismes de défense impliqués  
lors de la perception de la bactérie par la plante, et lors de l'établissement  
de la protection contre le froid et la pourriture grise.**



**Membres du Jury**

Pr M. Ongena	Université de Gembloux, Belgique	Rapporteur
Pr P. Rey	ENITAB-INRA Bordeaux, France	Rapporteur
Pr C. Clément	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Examineur
Pr M. Höfte	Université de Gent, Belgique	Examineur
Dr E. Ait Barka	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Co-directeur
Dr S. Dhondt-Cordelier	Université de Reims Champagne-Ardenne, France	Co-directeur



En souvenir de mes grand-parents,  
À ma famille,  
mes amis,  
mon Youyou,





## Remerciements

Tout d'abord, je remercie le Conseil Régional de Champagne-Ardenne d'avoir financé ce projet.

Mes remerciements vont également aux membres du Jury. Merci de l'intérêt que vous portez à mes travaux.

Je tiens à remercier le Pr. Christophe Clément, Directeur de l'URVVC et du laboratoire SDRP de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche. Merci de m'avoir accordé ta confiance, tes conseils et ton soutien pendant ces quatre années.

Essaïd, merci de m'avoir mis entre les mains ce sujet, de m'avoir laissée le gérer comme je le souhaitais. Merci de m'avoir fait partager tes connaissances. J'ai beaucoup appris à tes côtés.

Sandrine, merci d'avoir accepté de faire partie de ce projet et d'être devenue ma co-directrice. Merci pour ton énorme soutien, tes connaissances et les longues discussions que nous avons pu avoir. Merci de m'avoir écoutée dans les moments de doute. Je ne sais pas si j'en serais là aujourd'hui si tu ne m'avais pas encadrée.

Un grand merci à Stéphan pour m'avoir intégrée au projet 'cellules' : ça a été une bouffée d'oxygène pour moi. Je tiens également à remercier Fabienne et Fanja pour m'avoir formée à la technique de la qPCR, ainsi que pour leurs bons conseils quand des surprises se manifestaient.

Merci Olivier pour les longues discussions scientifiques, les délires musicaux en paillasse, le travail d'équipe et ton soutien. Bon courage pour la fin.

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire que j'ai connus pendant ma thèse : Phiphi, JLD, Laurence, FloF, Patricia, Hélène, Eric, Chantal, Cécile, Nono, Dali, Bertrand, Dédé, Andreas, Cédric, Nathalie, Sylvain, FloMG, Sandra, Sébastien, Camille, Lisa, Maryline, Steven, Sophie, Lucile (merci pour l'aide technique), Jérôme, Mathilde, Clémentine, Gaëlle, Barbara, Cathy, Fred, Alessandro, Parul, Gianni, Derry. Votre gentillesse, vos conseils ainsi que votre soutien m'ont permis de mener ce projet à terme.

Merci à toute la famille pour votre soutien. Je sais très bien que vous avez eu du mal pour certains à accepter le fait que je parte 'loin' de DZ. Partir dans l'est..., pour y faire quoi ? Ben oui, je vous avais dit qu'après le diplôme d'ingénieur ce serait terminé. Mais surprise ! J'espère que vous êtes fiers de moi aujourd'hui pour tout le travail que j'ai pu



accomplir. Je regrette seulement de ne pas avoir pu être davantage présente dans les moments difficiles, et de voir les deux nouveaux membres de la famille grandir.

Ma petite Jessica... Que dire de ces dernières années. Nous avons fait à peu de choses près la même formation. Nous avons partagé tellement de choses, tellement ri. Nous avons souffert (toi avant moi) ensemble, et comme on le dit, c'est notre devise : 'si on a signé c'est pour en c...'. Quel réconfort de discuter de mes angoisses, de mes joies, de mes galères... !

Merci mon 'Youyou'. Tu m'as connue joyeuse, triste, défaitiste, à bout de nerfs, mais tu as toujours été là pour moi. Je ne sais même pas comment te remercier de ton soutien. Sans toi, je ne serai jamais arrivée au bout de ce projet. Cela m'a pris plus de temps que prévu, mais je suis heureuse de pouvoir enfin t'annoncer que ça y est, j'ai terminé. Une nouvelle vie nous attend à présent...

Je ressens une énorme tristesse en pensant aux membres de ma famille qui m'ont vue commencer cette thèse mais qui malheureusement n'auront pu voir son aboutissement. 'Papie Dz', 'Papie Pluguf', Mamie 'Pluguf', Gilles : j'espère que vous êtes fiers de moi depuis là-haut.

Enfin, un énorme merci à mes deux ordinateurs qui m'ont soutenue jusqu'au bout, malgré les petites frayeurs qu'ils m'ont faites. Mission accomplie !!



# Sommaire

<b>Résumé .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>12</b>
<b>Liste des communications .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>16</b>
<b>1-La vigne .....</b>	<b>18</b>
1.1-Présentation botanique.....	18
1.2-L'importance de la filière vinicole et du champagne.....	18
1.3-Les maladies de la vigne.....	19
1.3.1-La pourriture grise.....	19
1.3.2-Le stress froid.....	20
<b>2-La résistance naturelle des plantes.....</b>	<b>21</b>
2.1-Perception des stress abiotiques .....	22
2.2-Reconnaissance de l'agent pathogène .....	22
2.2.1-PTI ou immunité primaire.....	22
2.2.2-ETI ou immunité secondaire.....	23
2.3-Les événements précoces.....	24
2.3.1-Les flux ioniques.....	24
2.3.2-Les MAPs kinases.....	25
2.3.3-Les formes actives de l'oxygène (FAOs).....	25
2.3.4-Les événements précoces chez la vigne .....	26
2.4-Les réponses de défense.....	26
2.4.1-La réaction d'hypersensibilité (RH).....	26
2.4.2-Le renforcement des parois cellulaires.....	28
2.4.3-Les phytoalexines.....	28
2.4.3.1-Voies de biosynthèse.....	29
2.4.3.2-Implication dans les réponses de défenses .....	29
2.4.3.3-Les phytoalexines de la vigne .....	30
2.4.4-Les protéines PR .....	30
2.4.4.1-Classification.....	30
2.4.4.2-Les protéines PR de la vigne.....	31
2.4.5-Les autres réponses de défense lors d'un stress froid .....	33
2.5-Les molécules de signalisation .....	34
2.5.1-L'acide salicylique (AS) .....	34
2.5.2-L'acide jasmonique (AJ).....	35
2.5.3-L'éthylène (ET).....	36
2.5.4-Les autres molécules de signalisation .....	37
2.5.5-Interconnexions entre les voies de signalisation .....	39
2.6-Les résistances systémiques.....	42
2.6.1-La SAR.....	42
2.6.1.1-Voie de signalisation dépendante de l'AS .....	42
2.6.1.2-Implication de l'AJ et de l'ET.....	43
2.6.2-L'ISR.....	43
2.6.2.1-Voies de signalisation dépendantes de l'AJ et l'ET.....	43
2.6.2.2-Voie de signalisation dépendante de l'AS .....	44
2.6.2.3-Les protéines PR dans l'ISR .....	45
2.7-La potentialisation .....	45
2.7.1-La potentialisation dans la SAR.....	46



2.7.2-La potentialisation dans l'ISR.....	47
2.7.3-L'application au champ.....	47
2.7.4-Le phénomène de potentialisation chez la vigne.....	48
<b>3-Les compléments à la résistance naturelle.....</b>	<b>49</b>
3.1-La lutte chimique.....	49
3.2-Les alternatives aux produits phytosanitaires.....	50
3.2.1-La sélection variétale.....	50
3.2.2-La transgénèse.....	50
3.2.3-Les éliciteurs.....	51
3.2.3.1-Les MAMPs.....	51
3.2.3.2-Les DAMPs et produits végétaux.....	52
3.2.3.3-Les éliciteurs commercialisés.....	53
3.2.3.4-Les éliciteurs de la vigne.....	54
3.2.4-Les micro-organismes bénéfiques.....	55
3.2.4.1-Classification des PGPMs.....	55
3.2.4.2-Les micro-organismes endophytes.....	56
3.2.4.3-Modes d'action des micro-organismes bénéfiques.....	57
3.2.4.4-Micro-organismes utiles pour lutter contre <i>B. cinerea</i> chez la vigne..	60
<b>4-Les <i>Burkholderia</i> sp. ....</b>	<b>61</b>
4.1-Description du genre.....	61
4.2-Les <i>Burkholderia</i> sp. en interaction avec les plantes.....	62
4.2.1-Les <i>Burkholderia</i> sp. phytopathogènes.....	62
4.2.2-Les <i>Burkholderia</i> sp. bénéfiques.....	63
4.2.2.1-Les souches rhizosphériques.....	63
4.2.2.2-Les <i>Burkholderia</i> sp. endophytes.....	63
4.2.2.3-Les <i>Burkholderia</i> sp. symbiotiques.....	64
4.2.2.4-Les effets sur les plantes.....	65
4.3- <i>Burkholderia phytofirmans</i> sp. nov. souche PsJN.....	65
4.3.1-Caractérisation et propriétés.....	65
4.3.2-L'interaction vigne- <i>B. phytofirmans</i> souche PsJN.....	66
<b>5-Déroulement de la thèse.....</b>	<b>67</b>
<b>6-Objectifs de la thèse.....</b>	<b>68</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>73</b>
<b>Chap 1 : l'interaction entre la vigne et <i>B. phytofirmans</i> souche PsJN engendre-t-elle une réponse immunitaire au niveau local ?.....</b>	<b>74</b>
<b>Publication 1 :</b> Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant-growth promoting rhizobacterium <i>Burkholderia phytofirmans</i> strain PsJN and the non-host bacterium <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ptsi</i> in grapevine cell suspensions.....	75
<b>Publication 2 :</b> Phenolic compound accumulation and ROS production in roots of <i>Vitis vinifera</i> L. colonized by the endophyte <i>Burkholderia phytofirmans</i> strain PsJN.....	87
<b>Chap 2 : caractérisation de l'interaction entre la vigne et <i>B. phytofirmans</i> souche PsJN lorsque la plante est exposée au froid.....</b>	<b>95</b>
<b>Publication 3 :</b> Priming <i>Vitis vinifera</i> L. with <i>Burkholderia phytofirmans</i> strain PsJN is correlated to better acclimation to low non-freezing temperatures.....	96





**Chap 3 : caractérisation de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN lorsque la plante est attaquée par *B. cinerea* .....107**

**Publication 4** : Protection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) against *B. cinerea* by the endophytic PGPR *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is associated with higher phytoalexin accumulation but not with priming of defense-related gene expression. ....108

**CONCLUSIONS.....119**

**PERSPECTIVES.....126**

**BIBLIOGRAPHIE .....132**

**ANNEXE .....157**

**Publication 5** : RNA extraction from grapevine woody canes for gene expression analysis by real-time RT-PCR.....158



## Résumé

La bactérie de type PGPR, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN, est capable de coloniser le système racinaire de la vigne et de diffuser jusqu'aux feuilles, inflorescences et baies. Mes travaux de thèse ont permis de mieux caractériser cette interaction. Nous avons tout d'abord montré que le contact de cellules de vigne avec la bactérie induit une alcalinisation du milieu, une expression de gènes de défense, une accumulation de composés phénoliques et des bursts oxydatif et nitrique. Ces résultats démontrent que cette bactérie est perçue par les cellules de vigne, cette perception engendrant une modification de son immunité. Par ailleurs, l'interaction entre la souche PsJN et la vigne confère à la plante une protection vis-à-vis de certains stress. Afin de mieux caractériser cette protection, nous avons analysé la mise en place de composés de défense en réponse à des stress biotique (*Botrytis cinerea*) ou abiotique (exposition à 4°C) dans des vitroplants entièrement colonisés par la bactérie.

Les plants bactérisés montrent une tolérance envers le froid (4°C). Cette protection est associée à la potentialisation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses de défense (*Cbf4*, *Lox*, *PAL*, *STS* et certains codant des protéines PR). Parallèlement, une accumulation de proline, ainsi qu'une activation plus rapide des systèmes de détoxification de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des aldéhydes (marqueurs de la peroxydation des lipides membranaires) ont été observées.

Par ailleurs, il a été démontré que *B. phytofirmans* souche PsJN protège la vigne contre *B. cinerea*. L'étude de l'expression de plusieurs gènes de défense (*Lox*, *PAL*, *STS*, *17.3* et ceux codant certaines protéines PR) n'a pu révéler la potentialisation de leurs expressions, celles-ci étant même parfois moins induites chez les vitroplants entièrement bactérisés. Par contre, cette protection a été associée à une accumulation plus importante de phytoalexines (resvératrol et ε-viniférine).

Ces travaux démontrent donc que la relation bénéfique qui s'établit entre la vigne et la souche PsJN, se manifeste par une protection contre le froid (4°C) ou *B. cinerea* via le phénomène de potentialisation. Cependant, des résultats préliminaires montrent que la présence de la bactérie localement semble être un facteur déterminant pour l'établissement de la résistance dans la mesure où aucune protection contre ces stress n'a été obtenue en condition systémique.

**Mots clés :** vigne, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN, PGPR, défense, choc froid, *Botrytis cinerea*, potentialisation.



## **Abstract**

The PGPR *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is able to colonize grapevine roots and to diffuse to leaves, inflorescences and berries. The present work aimed to better characterize this interaction. Firstly, our results showed that interaction between grapevine and this bacterium induced a medium alcalinization, defense gene expression, phenolic compound accumulation, nitric oxide and hydrogen peroxide productions. This demonstrated that strain PsJN was locally recognized by the plant cells, which triggered plant immunity modifications. Interaction between grapevine and strain PsJN also confers to the plant a protection against several stresses. In order to better characterize this protection, induced defense responses were analyzed in fully bacterized plantlets submitted to biotic (*Botrytis cinerea*) or abiotic (exposure at 4°C) stress.

The bacterium induced a protection against cold stress. This protection is correlated with priming of some stress-related gene expressions (*Cbf4*, *Lox*, *PAL*, *STS* and some coding for PR proteins). An accumulation of proline, and a faster activation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and aldehyde (lipid peroxidation markers) scavenging systems were also observed.

Moreover, it was demonstrated that *B. phytofirmans* strain PsJN protects grapevine against *B. cinerea*. Analysis of defense-related gene expressions (*Lox*, *PAL*, *STS*, *17.3* and some coding for PR proteins) showed no priming of their expressions, which was even sometimes less induced in bacterized plantlets. Nevertheless, the observed protection was correlated with a higher phytoalexin accumulation (resveratrol and ε-viniférin).

Thus, this work demonstrated that the beneficial relationship between grapevine and strain PsJN induced a protection against cold exposure (4°C) or *B. cinerea* attacks, which was correlated with priming phenomenon. Nevertheless, preliminary studies showed that the presence of strain PsJN locally seemed to be an important factor for resistance establishment, since no protection against these stresses was observed in a systemic context.

**Key words:** grapevine, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN, PGPR, defense, cold stress, *Botrytis cinerea*, priming.



## Liste des abréviations

ABA : acide abscissique	MAP : mitogen-activated protein
ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique	MAPK : MAP kinase
acd : accelerated cell death	MAPKK : MAPK kinase
AFP : protéine anti-froid	MAPKKK : MAPKK kinase
AIA : acide indole-3-acétique	MeJA : méthyl jasmonate
AJ : acide jasmonique	NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
AOC : appellation d'origine contrôlée	NahG : salicylate hydroxylase
AS : acide salicylique	NO : oxide nitrique
BABA : acide $\beta$ -amino-butyrique	NPR1 : non-expressor of PR-1
BCA : biocontrol agent	OGM : organisme génétiquement modifié
BTH : ester S-méthyl de l'acide benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioïque	OPDA : acide 12-oxo-phytodienoïque
BR : brassinostéroïdes	OPR : OPDA réductase
CBF : cold binding factor	PAD : phytoalexin deficient
CK : cytokinines	PAL : phénylalanine ammonia-lyase
COI : coronatine insensitive	PAMP : pathogenic-associated molecular pattern
DAMP : damage-associated molecular pattern	PDF1.2 : défensine (PR-12)
DAPG : 2,4-diacétylphoroglucinol	PGPB : plant growth-promoting bacterium
dnd : defense, no death	PGPF : plant growth-promoting fungus
EDS : enhanced disease susceptibility	PGPM : plant growth-promoting microorganism
EIN : ethylene insensitive	PGPR : plant growth-promoting rhizobacterium
ET : éthylène	PGPY : plant growth-promoting yeast
ETI : effector-triggered immunity	PIN : inhibiteur de protéase (PR-6)
ETR : ethylene receptor	PR : pathogenesis-related
ETS : effector-triggered susceptibility	PRR : pattern-recognition receptor
FAD : fatty acid desaturase	PsJN : <i>Burkholderia phytofirmans</i> souche PsJN
FAO : forme active de l'oxygène	<i>Pst</i> : <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
GA : gibbérellines	PTI : PAMP-triggered immunity
INA : acide 2,6-dichloroisonicotinique	RH : réaction d'hypersensibilité
ISR : résistance systémique induite	SAR : résistance systémique acquise
JAR : JA-resistant	SAU : surface agricole utile
JIN : JA-insensitive	SID : salicylic-acid-induction deficient
LOX : lipoxygénase	STS : stilbène synthase
LPS : lipopolysaccharides	UV : ultraviolets
LTP : lipid transfert protein	VOC : composé organique volatile
MAMP : microbial-associated molecular pattern	





## **Liste des communications**



## Articles

- **Bordiec S.**, Rabenoelina F., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clément C. and Baillieul F. (2010). RNA extraction from grapevine woody canes for gene expression analysis by real-time RT-PCR. In : Methodologies and Results in Grapevine Research (Delrot S., Medrano H., Or E., Bavaresco L., Grando S., eds), Springer, 290 p.
  
- **Bordiec S.**, Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., Ait Barka E., Kauffmann S., Jeandet P., Clément C., Baillieul F. and Dorey S. (2010). Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, sous presse. doi : 10.1093/jxb/erq291.
  
- Theocharis A.\*, **Bordiec S.\***, Fernandez O., Paquis S., Dhondt-Cordelier S., Baillieul F., Ait Barka E. and Clément C. Priming *Vitis vinifera* L. with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is correlated to better acclimation to low non-freezing temperatures. Soumise à *Physiologia Plantarum* (\*co-1<sup>er</sup> auteur).
  
- **Bordiec S.**, Jacquens L., Conreux A., Jeandet P., Clément C., Baillieul F., Dhondt S. and Ait Barka E. Protection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) against *B. cinerea* by the endophytic PGPR *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is associated with higher phytoalexin accumulation but not with priming of defense-related gene expression. En préparation.

## Communications orales

- Theocharis A., **Bordiec S.**, Fernandez O., Dhondt S., Ait Barka E., Baillieul F. and Clément C. (2010). Use of PGPR to improve grape tolerance to cold stress. Cool Climate Oenology and Viticulture Institute, Brock (Canada), conférence invitée.
  
- **Bordiec S.**, Theocharis A., Fernandez O., Baillieul F., Clément C. and Ait Barka E. (2010). Stress-related gene expression is primed in *Vitis vinifera* L. plantlets by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN upon low non-freezing temperatures. 9<sup>èmes</sup> Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois (France), 18-22 Janvier 2010.



- **Bordiec S.**, Theocharis A., Fernandez O., Baillieul F., Clément C. and Ait Barka E. (2009). *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN primed the expression of stress-related genes in *Vitis vinifera* L. upon low non-freezing temperatures. What's up in viticulture ? - COST 858 Final Meeting, Bordeaux (France), 27-30 Octobre 2009.
  
- **Bordiec S.**, Dhondt S. and Ait Barka E. (2009). Interaction entre *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN et *Vitis vinifera* L. INRA, Villenave d'Ornon (France), conférence invitée.
  
- **Bordiec S.**, Clément C. and Ait Barka E. (2008). Stimulation des défenses de la vigne par une PGPR : *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN. Prix des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims, Reims (France).
  
- Compant S., Ait Barka E., **Bordiec S.**, Belhadj A., Baillieul F. and Clément C. (2008). Effects of the PGPR *Burkholderia phytofirmans* on the stimulation of plant defence mechanisms and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. Cost Action 858, session "Agronomical practices", Porto (Portugal), conférence invitée.

### **Communications affichées**

- Fernandez O., **Bordiec S.**, Jacquens L., Dhondt-Cordelier S., Clément C., Ait Barka E. and Fontaine F. (2010). Sugar accumulation and photosynthesis regulation of bacterized grapevine plantlets submitted to cold stress. 4<sup>th</sup> International Symposium Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism, Postdam (Allemagne), 6-9 Octobre 2010.
  
- **Bordiec S.**, Paquis S., Lacroix H., Clément C., Baillieul F., Ait Barka E. and Dorey S. (2010). Characterization of defence responses induced by the endophytic PGPR bacteria *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN in grapevine cell suspensions. 9<sup>èmes</sup> Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois (France), 18-22 Janvier 2010.



# INTRODUCTION GENERALE







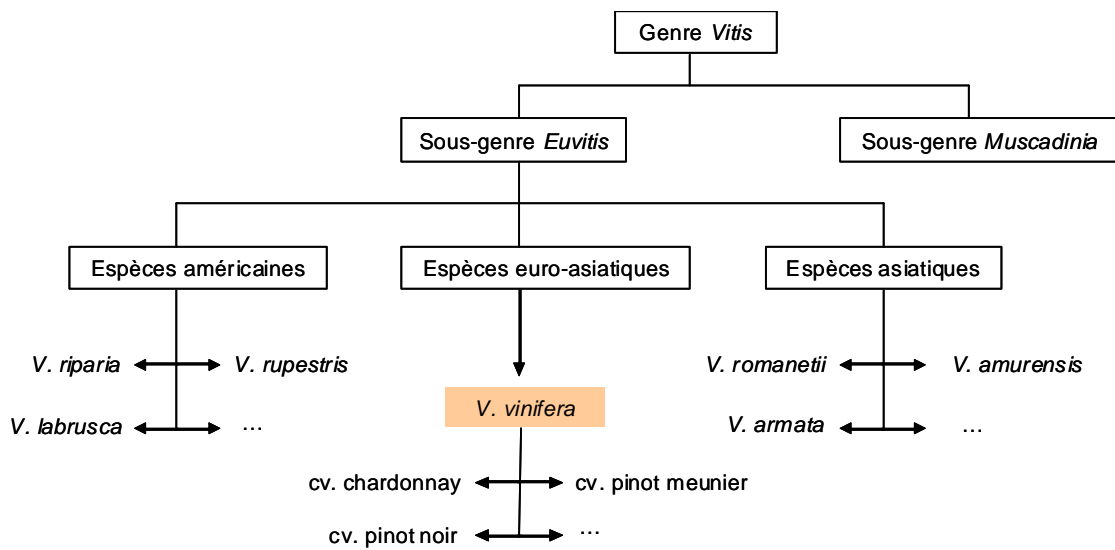


Fig. 1 : Classification systématique de l'espèce *Vitis vinifera* L. parmi la famille des *Vitaceae* (Planchon, 1887 ; Huglin & Schneider, 1998).

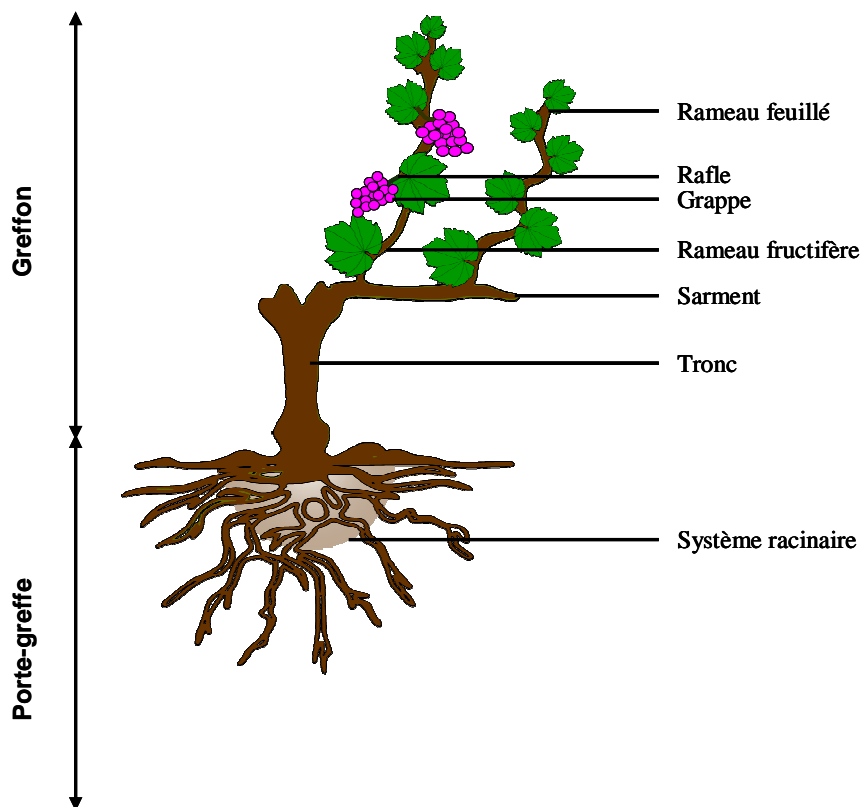


Fig. 2 : Morphologie du cep de vigne (Petit, 2008).

# **1-La vigne**

## **1.1-Présentation botanique**

La vigne, *Vitis* sp., est une angiosperme dicotylédone appartenant à la famille des *Vitaceae*, anciennement connue sous le nom *Ampelideae* (Planchon, 1887). Cette famille, associée aux *Rhamnaceae* et *Leeceae*, forme l'ordre des Rhamnales (Chadefaud & Emberger, 1960). Les *Vitaceae* sont en majorité des plantes ligneuses ou herbacées, mais certaines sont des arbustes à tiges sarmenteuses (Hellman, 2003). Le genre *Vitis* comprend deux sous-genres, *Muscadinia* et *Euvitis* (Fig. 1). La plupart des vignes cultivées appartiennent au sous-genre *Euvitis*, qui comprend lui-même 3 groupes : américain, euro-asiatique et asiatique *sensus stricto*. L'espèce *Vitis vinifera*, présente en Europe et Asie occidentale, se subdivise en milliers de variétés, appelées cépages ou cultivars, qui résultent de croisements naturels ou de sélection. Ces cépages se caractérisent notamment par les qualités aromatiques et gustatives de leurs baies et par leur mode de consommation : raisin de table, raisin de cuve ou raisin sec (Reynier, 2003).

Suite aux attaques du puceron phylloxéra en Europe à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le greffage de la vigne a été instauré par l'utilisation de porte-greffes issus de plants américains naturellement résistants à cette maladie (Reynier, 2003). Le porte-greffe produit donc le système racinaire qui colonise le sol tout au long de sa vie, tandis que le greffon (partie supérieure du cep) est constitué d'un tronc qui se divise en bras portant des bois de taille (sarments ; Fig. 2). Ces derniers donneront naissance à des rameaux feuillés qui pourront être fructifères (producteurs d'inflorescences aboutissant à l'apparition de grappes après fécondation) ou non.

## **1.2-L'importance de la filière vinicole et du champagne**

La culture de la vigne couvre de nos jours près de 8 millions d'hectares dans le monde, pour une production annuelle moyenne d'environ 300 millions d'hL de vin (www.vitisphere.com, données 2010). La majorité des vignes cultivées se concentre en Europe (63% du vignoble mondial), la France étant le premier producteur de vin au niveau mondial (www.vitisphere.com, données 2009). En France, la viticulture est une composante

Tableau 1 : Exemples de maladies de la vigne (d'après www.cousinie.com). Remarque : la coulure peut être également due à une taille prématurée ou trop importante, un sol trop fertile ou un apport trop important d'engrais et un mauvais choix de porte-greffe.

Type	Maladie	Agent responsable	Description
bactériose	<b>Broussin</b> <b>Nécrose bactérienne</b>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Xylophilus ampelinus</i>	tumeurs et excroissance de tissus (après blessure) destruction des organes en voie de croissance
mycoses	<b>Pourridié</b> <b>Excoriose</b> <b>Eutypiose</b> <b>Oïdium</b> <b>Mildiou</b> <b>Pourriture grise</b>  <b>ESC A/BDA</b>	<i>Armillaria mellea</i> , <i>Rosellinia necatrix</i> <i>Phomopsis viticola</i> <i>Eutypa lata</i> <i>Uncinula necator</i> <i>Plasmopara viticola</i> <i>Botrytis cinerea</i>  <i>Stereum hirsutum</i> , <i>Phellinus ignarus</i> , <i>Botryosphaeria obtusa</i> , <i>Botryosphaeria</i> <i>dothidea parva et stevensii</i>	affaiblissement des souches atteintes (mort en 2-3 ans) éclatement des bois raccourcissement des entre-nœuds, nanisme des rameaux ... nécroses noires, éclatement des baies tâche jaunâtre sur la face supérieure, feutrage blanc sur la face inférieure duvet gris sur les baies avec ramollissement des baies  mort des rameaux et du tronc par rupture de la circulation de la sève
viroses	<b>Court-noué</b> <b>Enroulement</b> <b>Marbrure</b>		entre-nœuds courts ou doubles, jaunissement des feuilles non maturation des baies échec au greffage, perturbation de la rhizogénèse des jeunes plants
mycoplasmoses	<b>Flavescence dorée</b> <b>Bois noir</b>	<i>Scaphoideus titanus</i> (insecte vecteur) <i>Hyalosthes</i> sp (insecte vecteur)	coloration du feuillage, mort des inflorescences, bois non ou mal aoûté enroulement, dessèchement, coloration des organes herbacés
ravageurs	<b>Phylloxera</b> <b>Erinose</b> <b>Altise</b> <b>Mouche du vinaigre</b>	<i>Viteus vitifoliae</i> <i>Colomerus vitis</i> <i>Haltica lythri</i> <i>Drosophila funebris fab</i>	mort rapide du pied par destruction des racines boursoufflures (face supérieure des feuilles), feutrage blanc (face inférieure) feuilles en dentelle parasite de blessure, forte odeur acétique au niveau des dommages
carences	<b>Carence en fer</b> <b>Carence en Bore</b> <b>Carence en Calcium</b>  <b>Carence potassique</b>		formation incorrecte de la chlorophylle coulure et millerandage sensibilité aux insectes piqueurs, mauvaise tenue des fruits chute très importante du nombre de baies, formation défectueuse des sucres, retard de maturité, mauvais aoûtement, résistance au gel réduite
accidents climatiques	<b>Grêle</b> <b>Gelées</b> <b>Coulure</b> <b>Millerandage</b>		destruction des récoltes destruction des récoltes en fonction du cycle de développement dessèchement de la fleur non fécondée ou du jeune raisin mauvais développement des grains causé par une fécondation incomplète

majeure de l'agriculture puisque, bien qu'elle n'occupe que 3,2% de la surface agricole utile (SAU), elle représente 17% de la valeur de la production agricole (www.viniflor.fr, données 2006).

En Champagne, plus de 33 000 ha sont consacrés à la culture de la vigne pour l'élaboration d'un vin blanc effervescent de renommée internationale : le champagne. Ce vin fait l'objet d'une appellation d'origine contrôlée (AOC) et représente un chiffre d'affaires d'environ 3,4 milliards d'euros pour 350 millions de bouteilles vendues chaque année (www.union-maisons-champagne.fr, données 2010). Il est majoritairement élaboré à partir de 3 cépages : Chardonnay, Pinot Meunier et Pinot noir.

### **1.3-Les maladies de la vigne**

Comme toutes les plantes, la vigne est soumise à l'attaque de nombreux agents pathogènes qui sont responsables de diverses maladies (Tableau 1). Elle peut ainsi être attaquée par des virus (GFLV pour 'Grapevine fanleaf virus', *Closterovirus* sp...), des mycoplasmes (transmis par des insectes vecteurs comme la cicadelle), des bactéries (*Xylophylus ampelinus*, *Agrobacterium vitis*...), des champignons (*Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Eutypa lata*...) et des ravageurs (acariens, nématodes et insectes). Cette plante est également sensible aux conditions climatiques et aux apports en ions et en minéraux (Tableau 1). Dans le cadre de mes travaux de recherche, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux réponses de la vigne lorsqu'elle est attaquée par *B. cinerea* ou exposée à un stress froid (4°C).

#### **1.3.1-La pourriture grise**

Cette maladie est causée par le champignon nécrotrophe *B. cinerea* (famille des Euscomycètes, classe des Leotiomycètes, forme asexuée). La forme sexuée (*Botryotinia fukeliana*) est rarement rencontrée dans la nature. Ce champignon, mondialement répandu, a la particularité de pouvoir infecter de nombreuses plantes, ce qui engendre des pertes pouvant atteindre 20% des récoltes mondiales (Elad *et al.*, 2004).



Fig. 3 : Baies de vigne infectées par *Botrytis cinerea* (www.altervino.free.fr).

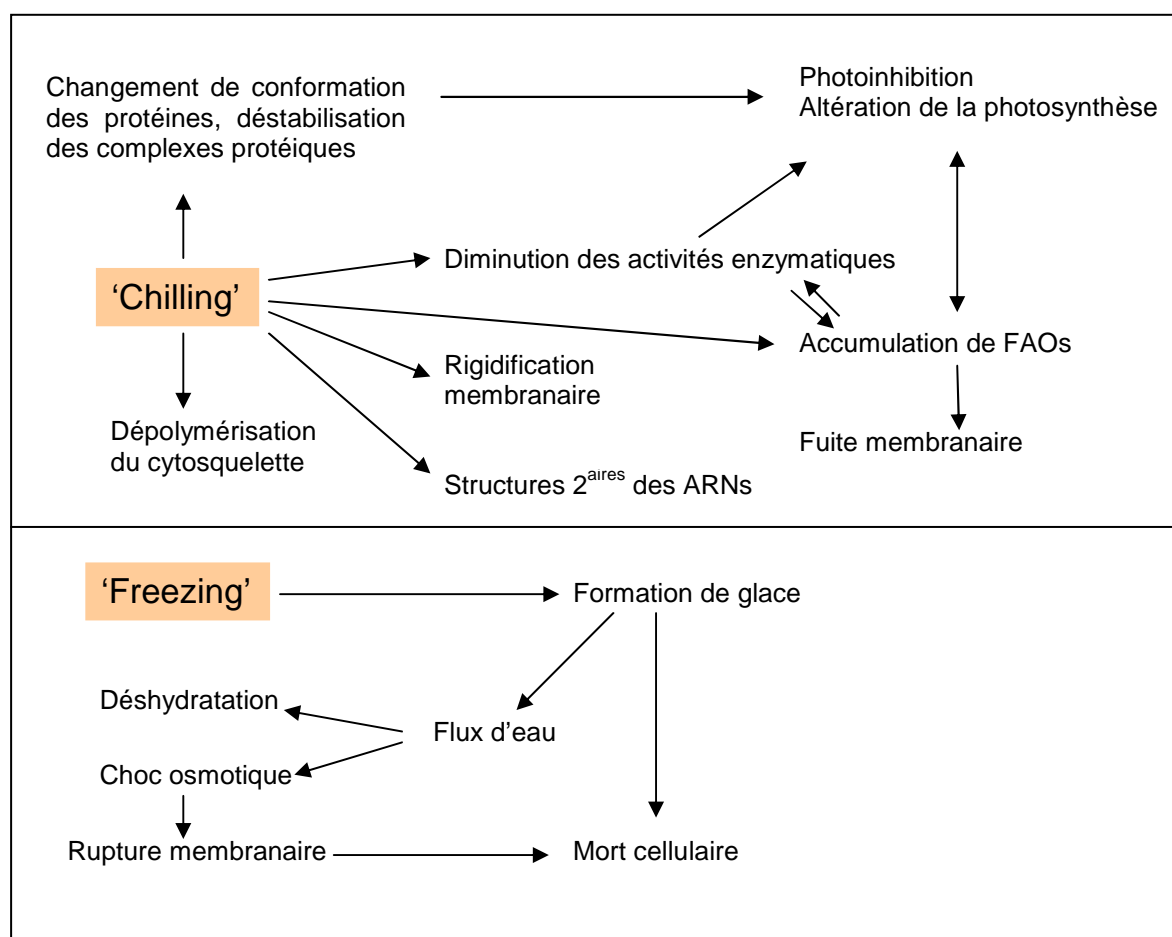


Fig. 4 : Dommages engendrés par les basses températures. FAOs : formes actives de l'oxygène (d'après Ruelland *et al.*, 2009).

Chez la vigne, *B. cinerea* est responsable de la pourriture grise des baies (Fig. 3), maladie aboutissant à des pertes de récolte importantes (Pezet *et al.*, 2004). Les pertes diffèrent d'une année sur l'autre en fonction des conditions climatiques, mais elles peuvent atteindre les 40% certaines années (Viniflor, données 2006). De plus, il a été démontré que la pourriture grise affecte la qualité des vins. En effet, elle provoque une diminution de la moussabilité ainsi qu'une altération de leurs qualités organoleptiques (Darriet *et al.*, 2000 & 2001 ; Marchal *et al.*, 2002). En France, chaque année, plusieurs centaines de millions d'euros sont dépensées pour lutter contre ce seul agent pathogène. Tous les organes peuvent être infectés, mais les fleurs et les baies sont les organes les plus sensibles. L'infection des fleurs est même considérée comme une étape clé dans le développement de la maladie au niveau des fruits (Pezet *et al.*, 2004). Le champignon peut infecter les inflorescences précocément au cours de la saison culturale, entrer en phase de latence pour ne se développer qu'au moment de la maturation des baies (Keller *et al.*, 2003). La contamination s'étend ensuite par simple contact entre les baies contaminées et les baies saines (Elad *et al.*, 2004 ; Pezet *et al.*, 2004). En revanche, sur de rares terroirs, *B. cinerea* peut être à l'origine de la pourriture noble qui permet d'obtenir des vins plus liquoreux (Sauternes, Coteaux du Layon...).

### **1.3.2-Le stress froid**

L'exposition des plantes à de basses températures est l'un des stress abiotiques les plus fréquents. Certaines plantes y sont sensibles, d'autres ont développé des mécanismes de défense leur permettant de minimiser les dégâts occasionnés. Toutefois, pour certaines espèces végétales, le froid est nécessaire pour induire la floraison (Alexandre & Hennig, 2008) ou la germination (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Il existe deux types de stress froid : le « **chilling** » (température supérieure à 0°C) et le « **freezing** » (température inférieure à 0°C). Une exposition antérieure des plantes à des températures sub-optimales modérées permet d'augmenter leur tolérance par le phénomène d'« **acclimatation** ». Dans ce cas, de nombreuses modifications physiologiques ou moléculaires ont été observées (Thomashow, 1999 ; Chinnusamy *et al.*, 2007).

Les dommages causés aux plantes par le froid sont variés (Fig. 4). Des températures négatives (« freezing ») provoquent la formation de cristaux de glace aux niveaux extra- ou/et intracellulaires (selon l'intensité du froid), ceux-ci pouvant occasionner la mort des tissus. De





manière générale, un froid moins intense (« chilling ») engendre une rigidification des membranes, une accumulation de **FAOs** (pour 'Formes Actives de l'Oxygène'), des modifications dans la conformation des protéines (et donc des perturbations dans l'activité des complexes enzymatiques) et une perturbation de la photosynthèse (Ruelland *et al.*, 2009 ; Theocharis, 2010). Les FAOs sont responsables de l'inactivation d'enzymes, la peroxydation des lipides (impliqués dans la fluidité et la rigidité membranaires), la dégradation de protéines et l'altération de l'ADN (Ruelland *et al.*, 2009).

En réponse au froid, la croissance de la vigne, son rendement et sa photosynthèse sont affectés (Buttrose, 1969 ; Hendrickson *et al.*, 2003 & 2004 ; Ait Barka *et al.*, 2006 ; Bertamini *et al.*, 2006). Plusieurs nuits froides (5-10°C) successives peuvent même inhiber complètement la photosynthèse et des températures inférieures à 15°C peuvent entraîner un retard de la floraison (Bertamini *et al.*, 2006). Le processus d'acclimatation au froid se manifeste chez la vigne *via* une accumulation d'amidon, de proline et de composés phénoliques (Ait Barka *et al.*, 2006).

## **2-La résistance naturelle des plantes**

Les plantes ont toutes le potentiel de se défendre suite à un stress grâce à un système de défense complexe impliquant des défenses constitutives (résistance passive) et des défenses induites (résistance active).

La résistance passive peut s'expliquer par le fait que le microorganisme est incapable de franchir les barrières protectrices externes du végétal (structure de la paroi, qualité et quantité de cires et cuticules) ou rencontre des substances antimicrobiennes naturellement présentes en l'absence de stress (phytoanticipines). De plus, l'agent pathogène, après avoir pénétrer dans la plante, peut ne pas s'y développer à cause d'une inadéquation physiologique préexistante chez l'hôte, permettant à celui-ci de ne pas être reconnu comme hôte par le micro-organisme ou d'empêcher ce dernier d'exercer son pouvoir pathogène.

Dans la résistance active, l'agent pathogène commence à se développer dans la plante, mais l'infection est stoppée par la mise en place de dispositifs de défenses non préexistants chez l'hôte. Dans cette première partie, les voies de signalisation des réponses de défense,

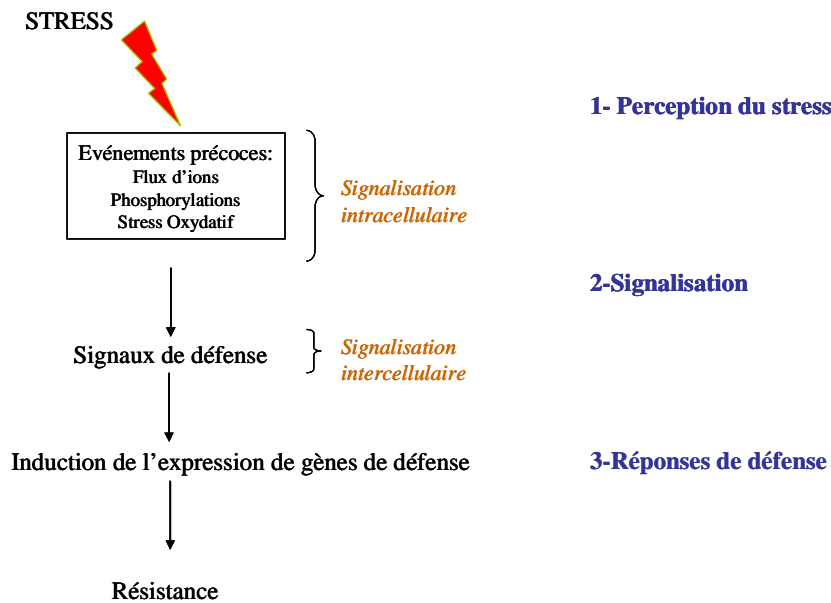


Fig. 5 : Principaux événements caractérisant la mise en place de la résistance des plantes.

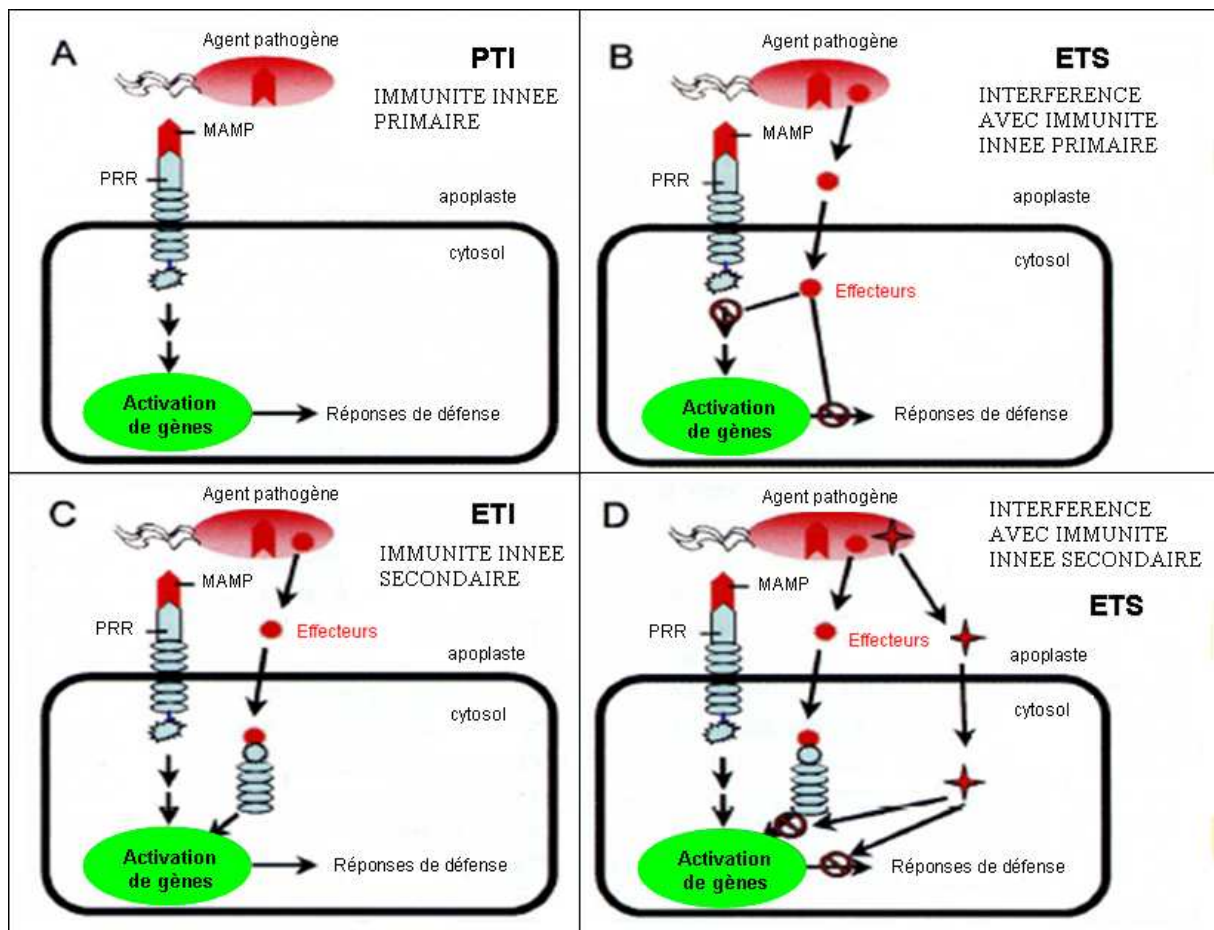


Fig. 6 : Évolution de l'immunité innée (PTI et ETI) chez les plantes. A : la PTI est déclenchée par la détection du MAMP. B : l'agent pathogène contourne la PTI par la sécrétion d'effecteurs inhibant les voies de signalisation ou de production des réponses de défense de la plante hôte qui est alors en ETS. C : l'ETI se met en place lorsque la plante hôte est capable de reconnaître les effecteurs ou leurs activités. D : l'agent pathogène contourne l'ETI par la production de nouveaux effecteurs. La plante est à nouveau en ETS. ETI : effector-triggered immunity ; ETS : effector-triggered susceptibility ; MAMP : microbial-associated molecular pattern ; PRR : pattern-recognition receptor ; PTI : pamp-triggered immunity (modifié d'après Kauffmann *et al.*, 2009).

depuis la perception du stress en passant par les étapes de transduction des signaux, pour aboutir aux réactions de défense seront présentées (Fig. 5).

## **2.1-Perception des stress abiotiques**

Les mécanismes de perception des stress abiotiques sont encore en partie méconnus. Lors d'un excès de lumière, des récepteurs photosensibles, comme par exemple les phototropines, les néochromes et les cryptochromes, vont capter l'information et transmettre le signal (Li *et al.*, 2009). Selon le rayonnement (longueur d'onde), certains de ces récepteurs peuvent également intervenir lors de radiations par les ultraviolets (UV) : les phytochromes pour la lumière rouge, les cryptochromes et les phototropines pour la lumière bleue et les UV-A, et il semblerait que des récepteurs (encore indéterminés) soient impliqués dans la perception des UV-B (Brosché & Strid, 2003 ; Rensing, 2010).

En revanche, dans le cas d'un stress hydrique, salin ou d'une exposition à de basses températures ('chilling' ou 'freezing'), la présence de récepteurs n'a pas encore été démontrée. Il semblerait que ce soit plutôt les dégâts causés par ces stress qui seraient détectés par la plante et engendreraient l'activation des mécanismes de défense (Knight & Knight, 2001 ; Verslues & Zhu, 2005 ; Walley *et al.*, 2007). Par exemple, la plante va percevoir le froid *via* les modifications de la fluidité membranaire, l'accumulation de FAOs, la réorganisation du cytosquelette ou la modification de la conformation des protéines (Knight & Knight, 2001 ; Walley *et al.*, 2007 ; Ruelland *et al.*, 2009).

## **2.2-Reconnaissance de l'agent pathogène**

Tout comme les animaux, les plantes sont capables de reconnaître le non-soi et le soi modifié, ainsi que d'induire des mécanismes de défense en réponse aux attaques d'agents pathogènes (Chisholm *et al.*, 2006 ; Jones & Dangl, 2006 ; Nürnberger & Kemmerling, 2009).

### **2.2.1-PTI ou immunité primaire**

Chez les végétaux, l'immunité innée primaire (Fig. 6.A) est basée sur la reconnaissance de **PAMPs** (pour '**P**athogenic-**A**ssociated **M**olecular **P**attern'), éléments

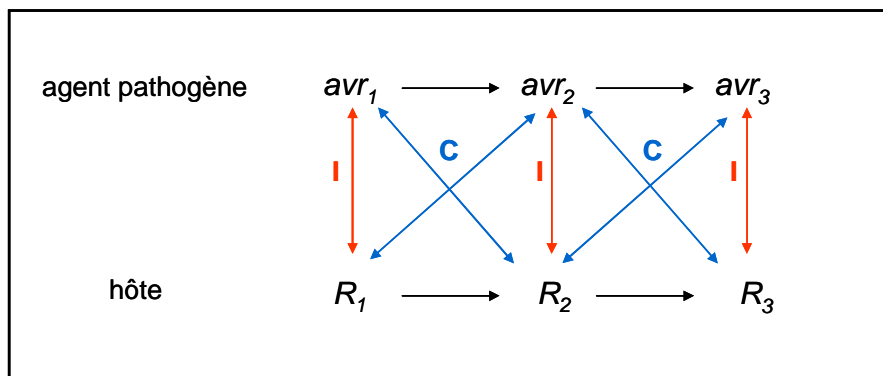


Fig. 7 : Modèle clé-serrure représentant les évolutions de l'agent pathogène et de la plante hôte dans le cadre de l'ETI. R : protéine de résistance présente chez la plante hôte ; avr : protéine d'avirulence présente chez l'agent pathogène ; I : réaction incompatible (non apparition de la maladie) ; C : réaction compatible (apparition de la maladie) ; ETI : effector-triggered immunity.

structuraux caractéristiques des agents pathogènes, par les **PRRs** (pour ‘**P**attern-**R**ecognition **R**eceptor’) de la plante. Cette reconnaissance aboutit à l’induction de la **PTI** (pour ‘**P**AMP-**T**riggered **I**munity’ ; Jones & Dangl, 2006 ; Boller & Felix, 2009 ; Postel & Kemmerling, 2009). Cependant, dans la mesure où de telles structures existent également chez les micro-organismes non pathogènes, le terme **MAMPs** (pour ‘**M**icrobial-**A**ssociated **M**olecular **P**attern’) semble plus approprié (Mackey & McFall, 2006 ; Jourdan *et al.*, 2008). De plus, certains produits de dégradation de la paroi des plantes (fragments d’oligogalacturonide, de cellulose ou des monomères de cutine), appelés **DAMPs** (pour ‘**D**amage-**A**ssociated **M**olecular **P**attern’), peuvent aussi initier la PTI (Postel & Kemmerling, 2009). Une description de certains MAMPs et DAMPs est présentée dans le paragraphe 3.2.3.

### **2.2.2-ETI ou immunité secondaire**

Pour contrecarrer cette 1<sup>ère</sup> ligne de défense, certains agents pathogènes sont capables de sécréter des effecteurs qui vont inactiver les PRRs ou bloquer le signal qu’ils émettent (Fig. 6.B). La plante est alors dans un état d’**ETS** (pour ‘**E**ffector-**T**riggered **S**usceptibility’) : la réaction est dite compatible (la plante est sensible et l’agent pathogène est virulent) et la maladie se manifestera. Les premiers effecteurs mis en évidence ont été les protéines AvrPto et AvrPtoB (He *et al.*, 2006). Par contre, lorsque les effecteurs sont reconnus, l’immunité mise en place par la plante est alors appelée **ETI** (pour ‘**E**ffector-**T**riggered **I**munity’, immunité secondaire ; Fig. 6.C ; Jones & Dangl, 2006 ; Boller & Felix, 2009 ; Postel & Kemmerling, 2009). Elle résulte d’une adaptation de la plante aux nouvelles techniques d’attaques mises en place par chaque agent pathogène et est donc en permanente évolution. L’ETI repose en fait sur le concept ‘clé-serrure’ ou ‘gène pour gène’ : à chaque protéine d’avorulence ‘**avr**’ chez le microbe correspond une protéine de résistance ‘**R**’ chez la plante. Dans ce cas, la réaction est dite incompatible (la plante est résistante et l’agent pathogène est avirulent), et la maladie ne se développera pas. Dans tous les cas, la plante et l’agent pathogène évoluent, ce qui leur permet d’assurer leur survie (Fig. 6.D ; Fig. 7 ; Yang *et al.*, 1997 ; Rathjen & Moffett, 2003 ; Kauffmann *et al.*, 2009).



## 2.3-Les événements précoces

La perception du stress va engendrer l'activation de réponses précoces et la transduction du signal au niveau intracellulaire. La survie de la plante dépendra de la vitesse et de l'efficacité de leur mise en place (Knight & Knight, 2001 ; Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Zipfel, 2009).

### 2.3.1-Les flux ioniques

La perception du stress est suivie par une phosphorylation/déphosphorylation des protéines membranaires qui engendre des flux ioniques (influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et d' $\text{H}^+$ , efflux de  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  ; Atkinson *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 1997 ; Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

Le calcium est l'un des seconds messagers majeurs chez les plantes. Il a été clairement établi que l'ouverture des canaux calciques est indispensable aux flux d'ions transmembranaires et l'induction de réponses de défense (Nürnberg *et al.*, 1994 ; Atkinson *et al.*, 1996 ; Faurie *et al.*, 2009). L'augmentation intracellulaire des ions  $\text{Ca}^{2+}$  active par la suite une cascade de **MAP** (pour 'Mitogen-Activated Protein') kinases (**MAPKs**) qui va activer différents facteurs de transcription, permettant ainsi l'induction de l'expression de gènes impliqués dans les réponses de défense (Pitzschke *et al.*, 2009).

Des études pharmacologiques indiquent que les canaux anioniques jouent un rôle important dans l'activation de nombreux événements induits par les éliciteurs ou les pathogènes, notamment la production de FAOs, l'activation de MAPKs et l'activation transcriptionnelle de gènes de défense (Jabs *et al.*, 1997 ; Ligterink *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002). En effet, l'une des fonctions des canaux anioniques des plantes serait l'initiation ou l'amplification de la dépolarisation de la membrane plasmique qui active à son tour des canaux calciques voltage-dépendants, responsables d'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracellulaire (Ward *et al.*, 1995). De plus, la dépolarisation de la membrane plasmique induite par les efflux d'anions pourrait activer des efflux de  $\text{K}^+$  *via* des canaux potassiques de la membrane plasmique, la sortie de  $\text{K}^+$  étant accompagnée d'une perte d'eau.

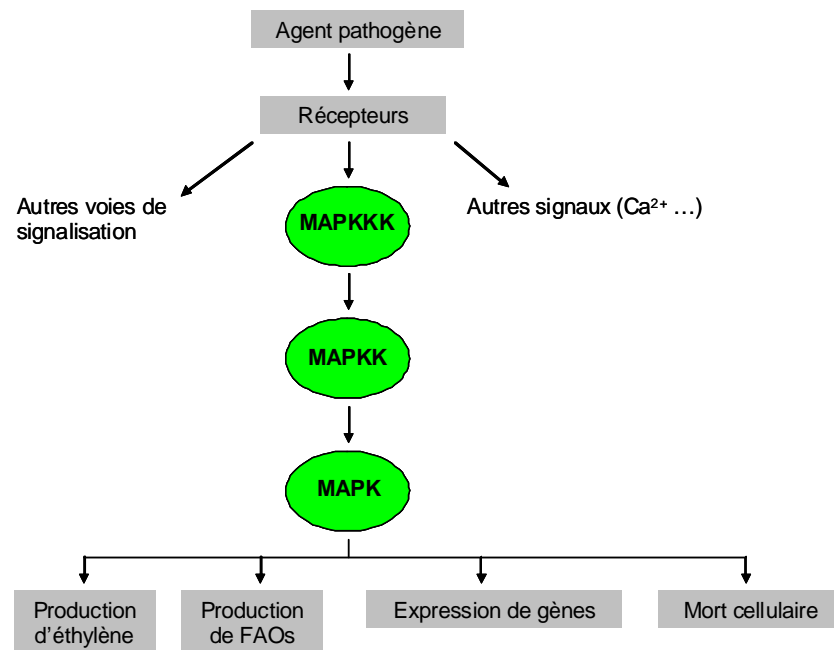


Fig. 8 : Voie de signalisation des MAPKs. FAOs : formes actives de l'oxygène (d'après Pedley & Martin, 2005).



L'influx de  $H^+$  va enfin provoquer une alcalinisation du milieu extracellulaire qui est toxique pour les agents pathogènes (Gerber & Dubery, 2004 ; Davies *et al.*, 2006).

### 2.3.2-Les MAPs kinases

La voie des MAPKs est une voie intracellulaire essentielle à la transduction du signal après la perception d'un stress (biotique ou abiotique), qui permet d'acheminer le signal depuis la surface des cellules (récepteurs) jusqu'au noyau (Colcombet & Hirt, 2008 ; Pitzschke *et al.*, 2009). Cette voie se caractérise par des cascades successives d'activation de kinases : l'activation d'une MAPK kinase kinase (**MAPKKK**) induit la phosphorylation d'une MAPK kinase (**MAPKK**) sur les résidus sérine et thréonine, qui va elle-même phosphoryler une MAPK sur les résidus tyrosine et thréonine (Fig. 8). La MAPK ainsi activée active certains facteurs de transcription ou migre par la suite dans le noyau ou pour influencer sur divers phénomènes : la production de FAOs et de messagers secondaires, l'expression de gènes impliqués dans les réponses de stress, et la mort cellulaire (Fig. 8 ; Xiong & Zhu, 2001 ; Pedley & Martin, 2005 ; Pitzschke *et al.*, 2009 ; Rodriguez *et al.*, 2010).

Chez l'arabette, plus de 110 gènes codant la voie des MAPKs ont été identifiés : 20 codant des MAPKs, 10 des MAPKKs et plus de 80 des MAPKKKs (Colcombet & Hirt, 2008). Parmi les MAPKs identifiées, seules trois sont impliquées dans les mécanismes de défense : MPK3, MPK4 et MPK6. Alors que MPK4 régule négativement la signalisation à la suite d'un stress biotique, MPK3 et MPK6 sont des médiateurs positifs des réponses de défense.

### 2.3.3-Les formes actives de l'oxygène (FAOs)

La perception d'un stress s'accompagne également de la production de FAOs (Chinnusamy *et al.*, 2004 ; Fujita *et al.*, 2006 ; Torres *et al.*, 2006). Les principales formes étudiées dans les interactions plante-agent pathogène sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroperoxyde ( $HO_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ , forme la plus stable) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ). Plusieurs enzymes interviennent dans la biosynthèse de FAOs au niveau de l'apoplasme et de la membrane, notamment les **NADPH**-oxydases (pour 'Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate') et les peroxydases. Les NADPH-oxydases participent à la synthèse d' $O_2^{\cdot-}$  et d' $H_2O_2$ , leur production générant un 'burst oxydatif' (Gerber & Dubery,

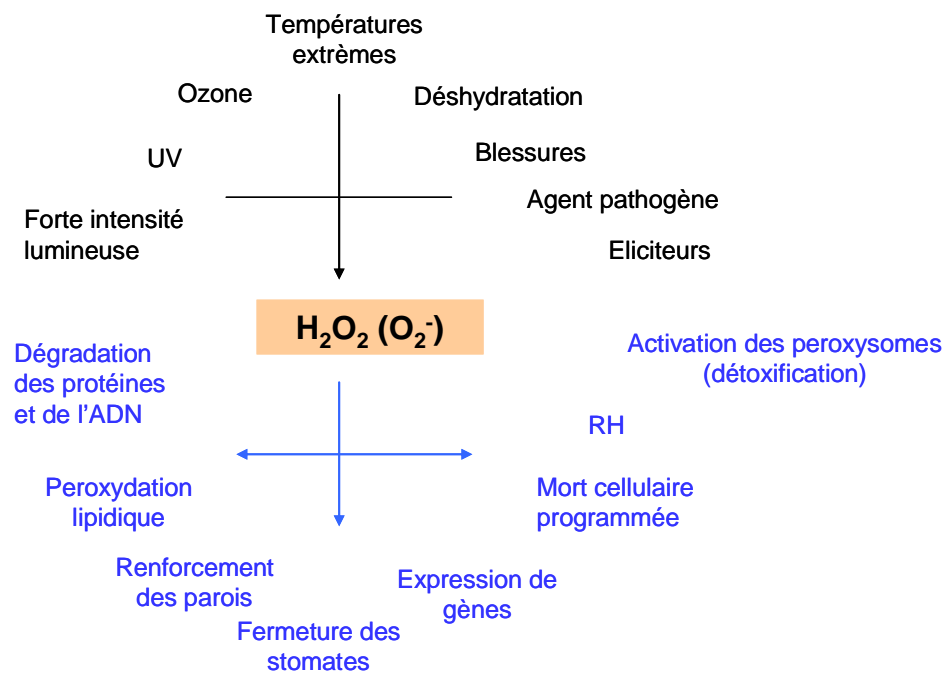


Fig. 9 : Voie de signalisation par l' $H_2O_2$  chez les plantes. En noir : les phénomènes induisant sa biosynthèse ; en bleu : les effets potentiels d'une accumulation d' $H_2O_2$  ; RH : réaction d'hypersensibilité (d'après Neill *et al.*, 2002).

2004 ; Mittler *et al.*, 2004 ; van Loon *et al.*, 2008). L'accumulation de FAOs s'effectue en 2 phases successives, mais seule la seconde est observée lors de réactions incompatibles (Levine *et al.*, 1994). Ce burst est lui-même impliqué dans l'activation des MAPKs, le renforcement des parois cellulaires, la mise en place de la réaction d'hypersensibilité (**RH**) et l'expression de gènes de défense, tout en ayant une activité cytotoxique directe vis-à-vis des micro-organismes (Fig. 9 ; Neill *et al.*, 2002 ; Chinnusamy *et al.*, 2004 ; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Chez la vigne, l'inhibition des NADPH-oxydases par l'application de diphénylène iodonium abolit la production de FAOs lorsque les cellules sont élicitées par des oligogalacturonides ou rhamnolipides (Aziz *et al.*, 2004 ; Varnier *et al.*, 2009).

En complément de ce 'burst oxydatif', une accumulation de monoxyde d'azote (**NO**), générant un 'burst nitrique', a également été démontrée, celle-ci pouvant favoriser la RH (Delledonne, 2005). Il peut également intervenir dans la modification de protéines par S-nitrosylation qui est impliquée dans les processus de résistance des plantes aux agents pathogènes (Feechan *et al.*, 2005 ; Hong *et al.*, 2008). D'ailleurs, l'infiltration d'inhibiteurs de la formation de NO conduit à une diminution de protéines S-nitrosylées et à une plus grande sensibilité de la plante à des agents pathogènes normalement avirulents (Delledonne, 2005).

#### **2.3.4-Les événements précoces chez la vigne**

Les événements précoces chez la vigne ont principalement été étudiés lors de la stimulation des mécanismes de défense par des éliciteurs (*cf* paragraphe 3.2.3.4).

### **2.4-Les réponses de défense**

À la suite d'un stress, les événements précoces vont déclencher la mise en place de réponses de défense au niveau local : RH, renforcement des parois cellulaires, synthèse de protéines antimicrobiennes ou de molécules permettant de réduire les dégâts occasionnés.

#### **2.4.1-La réaction d'hypersensibilité (RH)**

La **RH** se caractérise phénotypiquement par une mort cellulaire programmée rapidement mise en place par la plante suite à la perception d'un agent pathogène ou d'un



stress abiotique. Elle se manifeste dans la (les) cellule(s) atteinte(s), ce qui permet de restreindre l'invasion et ainsi d'éviter la contamination des tissus sains environnants. De nombreuses études ont montré que la RH est génétiquement contrôlée, notamment au niveau des locus *acd* ('accelerated cell death' ; Greenberg *et al.*, 1994 ; Van Baarlen *et al.*, 2007) et *dnd* ('defense, no death' ; Yu *et al.*, 1998 ; Clough *et al.*, 2000). Chez *A. thaliana*, les mutants *acd2* présentent des nécroses spontanées typiques d'une RH en l'absence d'un agent pathogène (Greenberg *et al.*, 1994), tandis que les mutants *dnd* ont perdu la capacité d'induire la RH (Yu *et al.*, 1998).

La RH est particulièrement efficace pour lutter contre de nombreux agents pathogènes (virus, bactéries, nématodes et champignons), mais il a été démontré qu'elle est insuffisante si les agents pathogènes sont de type nécrotrophe (Glazebrook, 2005). En effet, ces derniers sont capables de vivre sur des tissus morts, et il a été proposé qu'ils pourraient même induire la RH pour leur propre profit (Govrin & Levine, 2000 ; Govrin *et al.*, 2006 ; Garcion *et al.*, 2007). D'ailleurs, des mutants développant une RH tardive ou réduite sont généralement plus résistants à *B. cinerea*, tandis que ceux où la RH est accélérée sont plus sensibles (Van Baarlen *et al.*, 2007). Cependant, la RH n'est pas systématiquement nécessaire au processus de résistance. Les mutants d'arabette *dnd*, qui ont perdu la capacité d'induire la RH, développent un large spectre de résistance aux agents pathogènes *via* une production constitutive plus importante d'acide salicylique (AS) et une induction plus forte de l'expression de gènes codant des protéines PR ('Pathogenesis Related' ; Jurkowski *et al.*, 2004 ; Genger *et al.*, 2008). La RH est également impliquée dans les réponses de défense de la plante lors de stress abiotiques, notamment lors d'un stress par les UV (Danon & Gallois, 1998 ; Danon *et al.*, 2004).

La RH est stimulée et régulée par les flux ioniques (surtout le Ca<sup>2+</sup>), les FAOs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO) ou l'AS et elle est souvent associée à la production de phytoalexines et au renforcement des parois cellulaires (Lecourieux *et al.*, 2002 ; Garcion *et al.*, 2007). Cependant, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas obligatoirement nécessaire pour son établissement (Dorey *et al.*, 1999 ; Hirasawa *et al.*, 2005).



### 2.4.2-Le renforcement des parois cellulaires

Pour la plupart des agents pathogènes, la paroi végétale constitue le premier obstacle à franchir. Ainsi, il n'est donc pas étonnant que les plantes renforcent cette barrière structurale en réponse à leurs attaques (Garcion *et al.*, 2007). Parmi les principales substances qui viennent renforcer la paroi, on peut citer les appositions pariétales, la callose et la lignine.

Les **appositions pariétales** sont des structures riches en composés phénoliques qui s'accumulent au niveau du site d'infection, provoquant une réorganisation du cytosquelette, et sont souvent associées à la résistance (McLusky *et al.*, 1999). La **callose** ( $\beta$ -1,3-glucane) s'accumule au niveau et autour du site de pénétration pour former des papilles. Son rôle est de restreindre le développement (barrière physique) et la progression du champignon pathogène, notamment par l'arrêt des échanges nutritionnels entre le site d'infection et le reste de la plante (Garcion *et al.*, 2007). L'accumulation ou la production de callose a été observée dans des plants d'arabette résistants aux attaques de *Peronospora parasitica* et *Albugo candida* (Soylu *et al.*, 2003 & 2004) ou après traitements par des éliciteurs (Zimmerli *et al.*, 2000 ; Ton *et al.*, 2005). Chez la vigne, un traitement par le BABA (acide  $\beta$ -amino-butyrique) permet d'augmenter le dépôt de callose lors d'attaques par *Plasmopara viticola* (Hamiduzaman *et al.*, 2005). Le processus de **lignification** consiste en une accumulation de lignine sur l'intégralité de la paroi de la (les) cellule(s) infectée(s) ou à proximité du site d'infection. La lignine intervient dans la formation du xylème et du sclérenchyme et elle est synthétisée pendant le développement de la plante. Cependant, son accumulation est plus importante à la suite de stress biotiques ou abiotiques (Heitefuss, 2001 ; Hawkins & Boudet, 2003), où il a été noté que sa composition différait de celle produite lors de conditions non-stressantes (Lange *et al.*, 1995 ; Stange *et al.*, 2001). Il semblerait donc que la synthèse de lignine soit régulée par différentes voies de signalisation.

### 2.4.3-Les phytoalexines

Plus de 300 molécules ont été identifiées comme étant des phytoalexines à partir de 900 espèces de plantes représentant 40 familles. Elles peuvent être classées selon leur structure ou leur voie de biosynthèse. Les structures peuvent être majoritairement liées à un taxon ou communes à plusieurs espèces végétales. Par exemple, les sesquiterpènes sont présentes chez les solanacées, et les stilbènes sont produits par la cacahuète, la vigne et le pin.

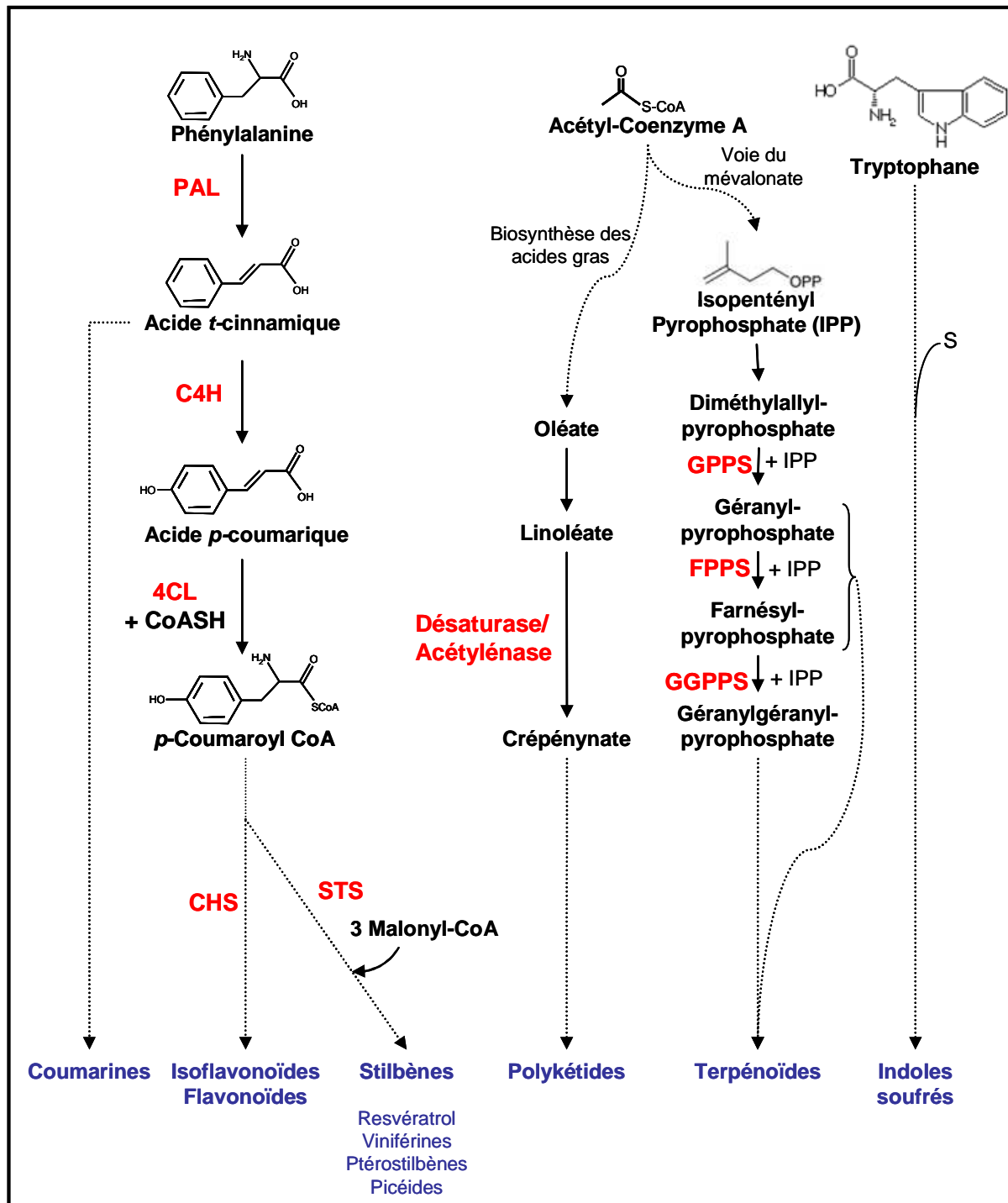


Fig. 10 : Voies de biosynthèse simplifiées des phytoalexines. PAL : phénylalanine amonia-lyase ; C4H : cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate:CoA ligase ; STS : stilbène synthase ; CHS : chalcone synthase ; GPPS : géranylpyrophosphate synthase ; FPPS : farnésylpyrophosphate synthase. Les flèches en pointillés indiquent la présence d'intermédiaires réactionnels (Le Hénañff, 2009).



Cependant, une même plante peut synthétiser différentes phytoalexines comme par exemple le riz qui en possède 16 (Garcion *et al.*, 2007).

#### 2.4.3.1-Voies de biosynthèse

Le nombre de voies principales de biosynthèse des phytoalexines est plutôt faible compte-tenu de la grande diversité des molécules (Fig. 10). Il existe 4 familles de phytoalexines : les phénylpropanoïdes, les terpénoïdes, les polykétides et les indoles soufrées (Fig. 10). La plupart de ces molécules appartient à la famille des phénylpropanoïdes. Le point de départ de cette voie est la catalyse de la phénylalanine en acide *trans*-cinnamique par la phénylalanine ammonia-lyase (**PAL**). Plusieurs classes de phytoalexines, dont les coumarines, les flavanoïdes (*via* la chalcone synthase) et les stilbènes (*via* la stilbène synthase (**STS**)), sont issues de ce composé. Le métabolisme des stilbènes a récemment été décrit par Chong *et al.* (2009). sont d'autres familles de phytoalexines.

#### 2.4.3.2-Implication dans les réponses de défenses

Plusieurs études ont mis en évidence la production de phytoalexines à proximité du site d'attaque de l'agent pathogène (Hain *et al.*, 1993 ; Verhagen *et al.*, 2010). Toutefois, elles ne sont pas forcément requises pour la résistance dans tous les pathosystèmes. En effet, l'incorporation chez le tabac du gène codant la STS permet d'augmenter sa résistance contre *B. cinerea* (Hain *et al.*, 1993), phénomène également observé chez la papaye contre *Phytophthora palmivora* et dans d'autres modèles plante/agent pathogène (Zhu *et al.*, 2004 et références citées dans cet article). Par contre, aucune résistance n'a été observée pour d'autres pathosystèmes, notamment chez le kiwi et le peuplier (Kobayashi *et al.*, 2000 ; Giorcelli *et al.*, 2004). De même, des mutants *pad3* ('**phytoalexin** **d**eficient' type **3**) d'arabette, déficients en synthèse de camalexine (phytoalexine d'*A. thaliana*), sont plus sensibles à *Alternaria brassicicola* que les plantes sauvages, alors que leur sensibilité pour d'autres agents pathogènes n'est pas affectée (Thomma *et al.*, 1999b). Enfin, la synthèse des phytoalexines peut également être induite en réponse à des stress abiotiques ou des traitements par des éliciteurs (Chong *et al.*, 2009). Par exemple, chez la cacahuète, une accumulation de resvératrol (phytoalexine de type stilbène) a été observée à la suite de radiations UV et de blessures, mais aussi après traitement par l'AS, l'acide jasmonique (**AJ**) et l'éthéphon (composé éthylénique ; Chung *et al.*, 2003 ; Tang *et al.*, 2010)

Tableau 2 : Les différentes classes de protéines PR. LTP : lipid transfert protein ; nd : non déterminé ; PR : pathogenesis-related (d'après van Loon *et al.*, 2006b ; Sels *et al.*, 2008).

<b>Protéine PR</b>	<b>Membre type</b>	<b>Activité enzymatique</b>	<b>Cible</b>
PR-1	tabac PR-1a	inconnue	nd
PR-2	tabac PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase	glucanes de paroi
PR-3	tabac P, Q	chitinase de type I à VII	chitine de paroi
PR-4	tabac R	chitinase de type I, II	chitine de paroi
PR-5	tabac S	osmotine	membrane
PR-6	tomate, inhibiteur I	inhibiteur de protéase	nd
PR-7	tomate P69	endoprotéase	nd
PR-8	concombre, chitinase	chitinase de type VIII	chitine de paroi
PR-9	tabac 'lignin-forming peroxidase'	Péroxydase	nd
PR-10	persil, PR1	RNase	nd
PR-11	tabac chitinase de type V	chitinase de type I	chitine de paroi
PR-12	radis Rs-AFP3	défensine	membrane
PR-13	arabette TH12.1	thionine	membrane
PR-14	orge LTP4	LTP	membrane
PR-15	orge OxOa (germine)	oxalate oxydase	nd
PR-16	orge OXOLP	oxalate oxydase-like	nd
PR-17	tabac PRp27	inconnue	nd

### 2.4.3.3-Les phytoalexines de la vigne

Les phytoalexines de la vigne appartiennent à la classe des **stilbènes**. Le resvératrol est la principale phytoalexine de la vigne mais il constitue également un précurseur pour d'autres composés antimicrobiens tels que la viniférine et le ptérostilbène (Jeandet *et al.*, 2002 ; Chong *et al.*, 2009 ; Donnez *et al.*, 2009). Le resvératrol est synthétisé constitutivement dans le bois (phytoanticipine) mais il s'accumule significativement dans les feuilles et les baies à la suite d'un stress (Donnez *et al.*, 2009). L'expression des gènes *STS*, catalysant la synthèse de resvératrol à partir d'une molécule de p-coumaryl-CoA et 3 molécules de malonyl-CoA (Chong *et al.*, 2009), ainsi que la synthèse de stilbènes sont induites chez la vigne après l'attaque d'agents pathogènes d'origine fongique tels que *Erysiphe necator* (Schnee *et al.*, 2008), *Plasmopara viticola* (Adrian *et al.*, 1997) et *B. cinerea* (Bézier *et al.*, 2002). L'incorporation d'un gène codant une *STS* a d'ailleurs permis d'accroître la production de resvératrol dans les plantes transgéniques de vigne (Fan *et al.*, 2008) et une meilleure résistance de vitroplants vis-à-vis de *B. cinerea* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). Leur synthèse peut également être induite par les UV ou les ions aluminium (Chong *et al.*, 2009). Sur des cultures cellulaires traitées par du méthyl jasmonate (**MeJA**), Tassoni *et al.* (2005) et Belhadj *et al.* (2008b) ont observé une production accrue de stilbènes, ceci étant corrélé à l'induction de PAL et *STS* aux niveaux transcriptomique et protéique. Sur des feuilles, le MeJA et l'éthéphon produisent les mêmes effets, ce qui aboutit à une protection contre l'agent responsable du mildiou (Belhadj *et al.*, 2006 & 2008a). Ces résultats démontrent donc que la biosynthèse des stilbènes est régulée par les voies dépendantes de l'AJ et l'éthylène (**ET**).

### 2.4.4-Les protéines PR

#### 2.4.4.1-Classification

Des protéines **PR** (pour 'Pathogenesis-Related') sont produites par la plante à la suite de divers stress (Tuzun & Somanchi, 2006). Ces composés ont été initialement décrits chez le tabac suite à l'infection par le virus de la mosaïque du tabac (Gianinazzi *et al.*, 1970 ; van Loon & van Kammen, 1970). Depuis, 17 familles de protéines PR ont été identifiées chez de nombreuses espèces végétales (Tableau 2). Elles sont classées selon leurs structures et leurs activités biologiques (Edreva, 2005 ; van Loon *et al.*, 2006b ; Sels *et al.*, 2008).



La majorité des protéines PR possède des activités anti-microbiennes. Les  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) ainsi que les chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11) sont capables de dégrader les parois fongiques (Tuzun & Somanchi, 2006). À celles-ci s'ajoutent les osmotines (PR-5) qui perturbent la perméabilité membranaire des agents pathogènes (Vigers *et al.*, 1992 ; Hu & Reddy, 1997 ; van Loon, 1997), les inhibiteurs de protéases (PR-6) qui bloquent les protéines digestives et/ou les effecteurs de l'agent pathogène (Lorito *et al.*, 1994 ; Sels *et al.*, 2008), ainsi que les endoprotéases (PR-7) qui seraient impliquées dans la dissolution des parois cellulaires microbiennes (van Loon *et al.*, 2006b). Les peroxydases (PR-9) sont impliquées aussi bien dans le métabolisme de l'auxine et la biosynthèse de l'ET que dans la formation de lignine (Lagrimini *et al.*, 1987). Les N-glycosidases (PR-10) inhibent la synthèse protéique chez les agents pathogènes (Stirpe *et al.*, 1992). Les défensines, thionines et **LTP** (pour 'Lipid Transfer Protein'), respectivement PR-12, PR-13 et PR-14, possèdent des activités antifongiques, parfois antibactériennes voire même insecticides pour les défensines (van Loon & Strien, 1999 ; Wijaya *et al.*, 2000 ; van Loon *et al.*, 2006b ; Sels *et al.*, 2008). Chez les monocotylédones, des PR-15 et PR-16 ont également été caractérisées. Elles sont à l'origine d' $H_2O_2$  cytotoxique pour les agents pathogènes et peuvent induire directement ou indirectement les réactions de défense de la plante (Donaldson *et al.*, 2001 ; Hu *et al.*, 2003). À ce jour, seules les familles des PR-17 (mises en évidence chez le tabac, l'orge et le blé) et des PR-1 sont encore de fonction inconnue (Alexander *et al.*, 1993 ; Niderman *et al.*, 1995 ; van Loon *et al.*, 2006b).

#### 2.4.4.2-Les protéines PR de la vigne

Chez la vigne, de nombreuses protéines PR ont été identifiées, notamment dans les feuilles, mais également dans d'autres organes comme les baies ou les racines. Elles peuvent être synthétisées constitutivement ou induites à la suite d'un stress.

Indépendamment d'une infection, les osmotines (ou 'thaumatin-like', PR-5) peuvent s'accumuler dans les feuilles et les baies en cours de maturation et peuvent être corrélées à l'augmentation de la teneur en sucre des baies (Tattersall *et al.*, 1997 ; Salzman *et al.*, 1998 ; Monteiro *et al.*, 2003). Certaines d'entre-elles possèdent une forte activité antifongique *in vitro* envers *B. cinerea*, *Phomopsis viticola* et *E. necator* (Salzman *et al.*, 1998 ; Monteiro *et al.*, 2003).



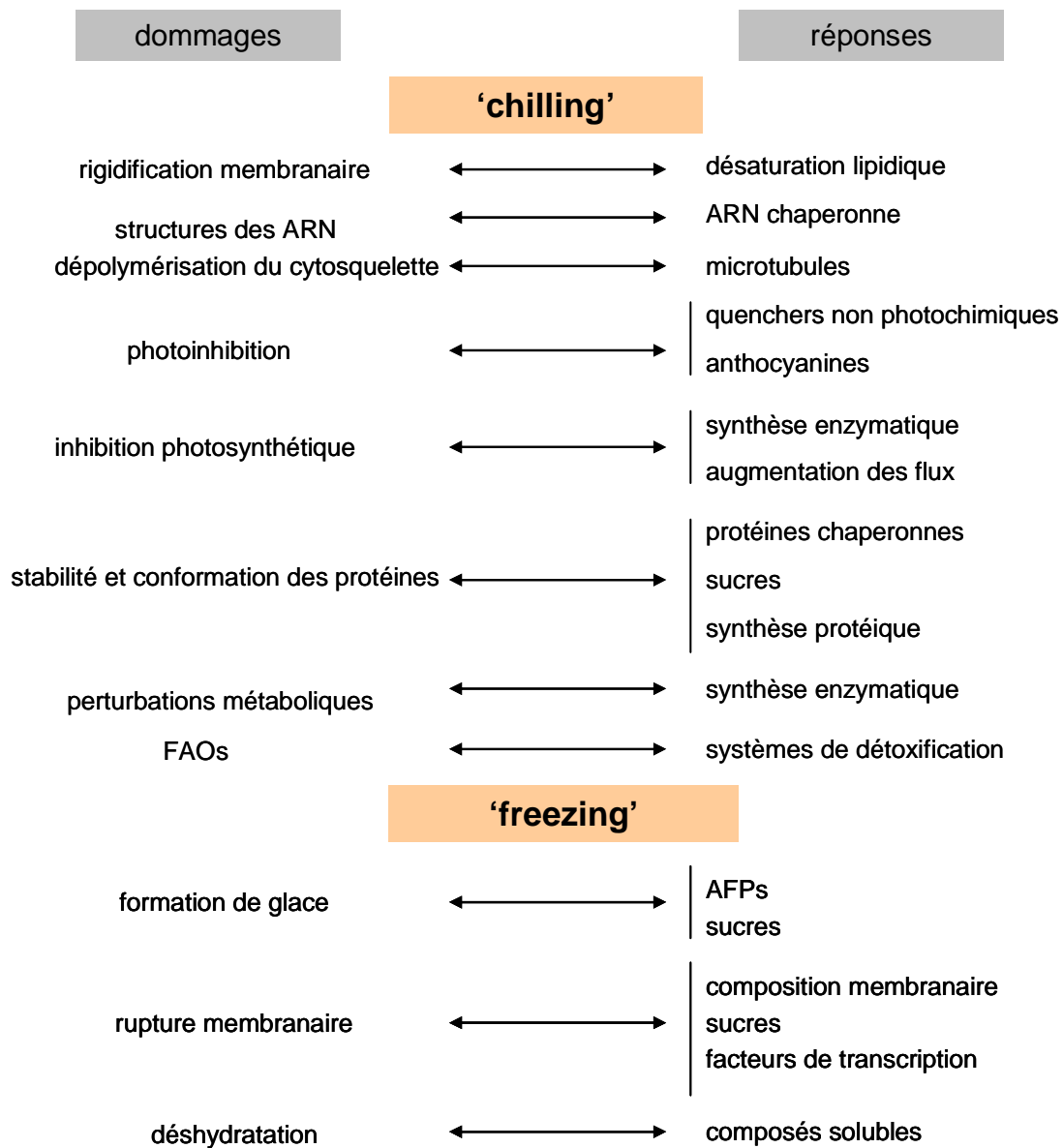
Un peptide antimicrobien VvAMP1, appartenant à la famille des défensines (PR-12), a récemment été isolé dans des baies en cours de maturation (de Beer & Vivier, 2008). Ce peptide présente, *in vitro*, une activité antifongique vis-à-vis de *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *Verticillium dahliae*. Il pourrait ainsi participer à la défense constitutive de la baie.

Lors d'un stress biotique ou d'un traitement par des éliciteurs, la synthèse de nombreuses protéines PR peut être induite. Plusieurs isoformes de chitinases acides et basiques, dont le rôle est de dégrader la chitine (composé essentiel de la paroi des champignons), ont été isolées dans différents tissus (Derckel *et al.*, 1996 & 1998). Leur synthèse est stimulée par une application d'AS ou une blessure ainsi qu'en réponse à une infection par des agents pathogènes (Derckel *et al.*, 1996 ; Busam *et al.*, 1997). Par exemple, la chitinase 1b (VvChit 1b, PR-3) est exprimée dans les feuilles lors de l'infection par *B. cinerea*, mais pas lors de l'interaction avec *P. syringae* pv. *pisi* (organisme non-hôte ; Robert *et al.*, 2002). Kortekamp (2006) suggère que les PR-3 et PR-4 sont des marqueurs de la résistance à *P. viticola* chez la vigne. Certaines chitinases possèdent même, *in vitro*, une activité antifongique envers *B. cinerea* et *Guignardia bidwellii*, champignon responsable de la pourriture maculée ('Black rot' ; Salzman *et al.*, 1998).

Des  $\beta$ -1, 3-glucanases (PR-2), responsables de la dégradation des glucanes de la paroi des champignons, ont été isolées dans les feuilles (Renault, 1998). Une étude a montré *in vitro* un effet synergique entre des chitinases et des glucanases extraites de feuilles sur l'inhibition du développement des spores d'*E. necator* (Giannakis *et al.*, 1998).

Des LTPs (PR-14) ont également été décrites. Leur expression est induite par l'ergostérol (éliciteur d'origine fongique) et l'AJ (Gomès *et al.*, 2003). Certaines isoformes peuvent inhiber la germination des spores de *B. cinerea* *in vitro* (Gomès *et al.*, 2003). Des RNases (PR-10) ont aussi été isolées dans les feuilles (Renault, 1998 ; Robert, 2001) .Il a été démontré que les transcrits de PR-10 et PR-14 s'accumulent significativement lors de l'interaction incompatible vigne-*P. syringae* pv *pisi* (bactérie non-hôte ; Robert *et al.*, 2001). Enfin, des PR-1, de fonction encore inconnue, ont été retrouvées dans des feuilles infectées par *Oidium tuckeri* (Repka *et al.*, 2000).

Les protéines PR ne sont pas seulement induites localement, elles peuvent aussi être induites de manière systémique, ceci étant associé à la **résistance systémique acquise (SAR)** ou à la **résistance systémique induite (ISR)** (*cf* paragraphe 2.6).



**Fig. 11** : Dommages engendrés par les basses températures et les réponses de défense mises en place par la plante. FAOs : formes actives de l'oxygène ; AFPs : protéines anti-froid (d'après Ruelland *et al.*, 2009).



### **2.4.5-Les autres réponses de défense lors d'un stress froid**

D'autres composés ou phénomènes physiologiques sont impliqués dans les mécanismes de défense induits en réponse au froid (Fig. 11) :

✓ **Modification de la composition des membranes.** Une désaturation des lipides qui permet de rendre les membranes plus fluides, une augmentation des phospholipides et une diminution des monogalactosyldiacylglycérols ont été observées (Ruelland *et al.*, 2009).

✓ **Facteurs de transcription** ou **gènes** spécifiques des réponses suite à un stress froid. Par exemple, les gènes *COR* ('cold regulated'), *LTI* ('low-temperature induced'), ou *KIN* ('cold induced') sont induits significativement dans les heures suivant l'exposition au froid (Thomashow, 1999). Chez *A. thaliana*, les facteurs de transcription de la famille des **CBF** ('Cold Binding Factor' ; CBF1-3) régulent notamment l'expression des gènes *COR* (Mahajan & Tuteja, 2005 ; Chinnusamy *et al.*, 2009). Récemment, le gène *CBF4*, correspondant à *CBF1* chez *A. thaliana*, a été isolé spécifiquement chez la vigne en réponse à une exposition de la plante aux basses températures (Xiao *et al.*, 2008). Son expression étant induite précocement dans tous les organes de la vigne dès les premières heures suivant le début du stress, ce gène semble donc être un excellent marqueur moléculaire spécifique d'un stress froid chez la vigne.

✓ **Protéines de stress.** L'accumulation de protéines hydrophiles a été largement démontrée en réponse au froid. Ces protéines comprennent notamment (i) les **déhydrines** dont le rôle est de prévenir la déstabilisation des membranes, et (ii) les **protéines chaperonnes** qui stabilisent la conformation des ARNs (Ruelland *et al.*, 2009). De plus, certaines protéines **PR**, notamment les chitinases et les glucanases, peuvent également être induites lorsque les plantes sont soumises à de basses températures ('chilling' ou 'freezing' ; Hon *et al.*, 1995 ; van Loon & Van Strien, 1999 ; Huang & Duman, 2002). Selon le type de stress, elles seront donc classées en protéines anti-gel (**AFPs** pour 'anti-freeze proteins' ; Griffith & Yaish, 2004) ou en protéines PR (van Loon & Van Strien, 1999). Les AFPs sont sécrétées dans l'apoplasme et se lient irréversiblement à la surface de la glace, ce qui permet d'abaisser la température de congélation des tissus.

✓ **Sucres.** De nombreuses études ont révélé une accumulation des sucres solubles en réponse au froid, notamment les galactinol, raffinose, glucose et fructose (Ruelland *et al.*, 2009 ; Theocharis, 2010). Leurs accumulations ont pour rôle de modifier le potentiel

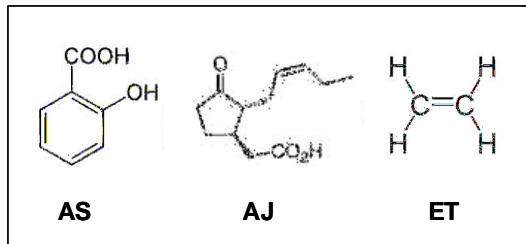


Fig. 12 : Structures chimiques des principales molécules de signalisation. AS : acide salicylique ; AJ : acide jasmonique ; ET : éthylène.

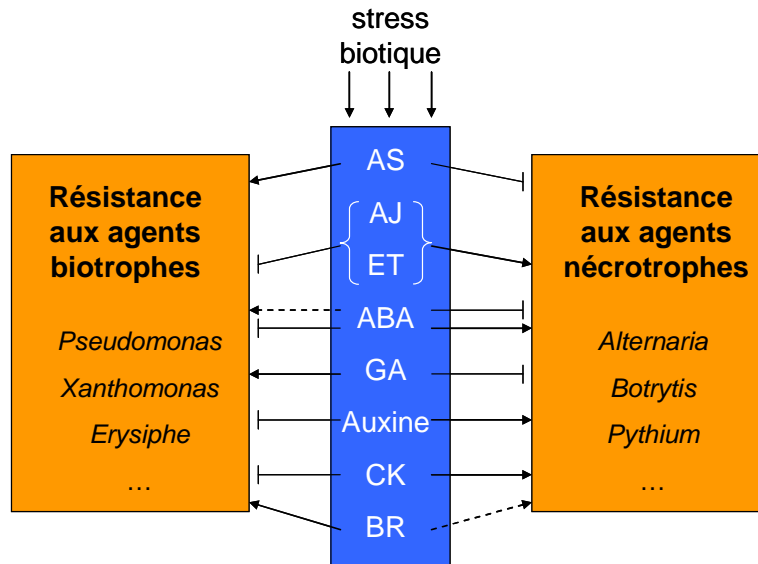


Fig. 13 : Schéma simplifié montrant l'implication des hormones dans l'établissement de la résistance lors de stress biotiques. Les flèches indiquent une activation ( $\rightarrow$ ) ou une interaction positive ( $---\rightarrow$ ) dans le développement de la résistance. ABA : acide abscissique ; AJ : acide jasmonique ; AS : acide salicylique ; BR : brassinostéroïdes ; CK : cytokinines ; ET : éthylène ; GA : gibbérellines (d'après Bari & Jones, 2009).

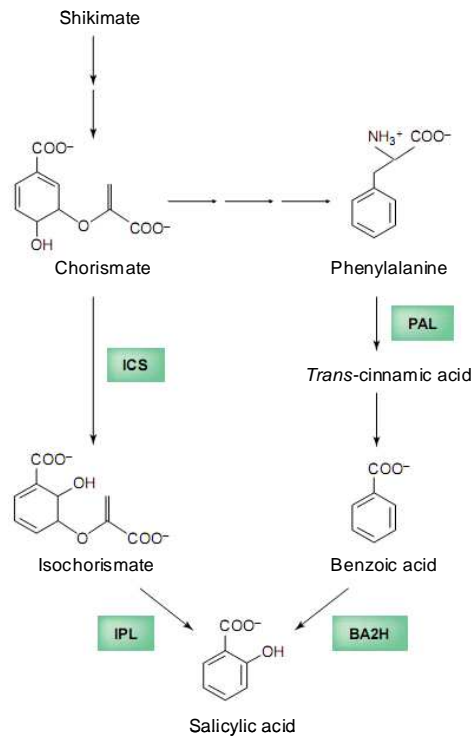


Fig. 14 : Voie de biosynthèse de l'acide salicylique chez *A. thaliana*. PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; IPL : isochorismate pyruvate lyase ; BA2H : benzoic-acid-2-hydroxylase ; ICS : isochorismate synthase (Shah, 2003).

osmotique, d'abaisser le point de congélation ainsi que de compenser la perte en eau (Ruelland *et al.*, 2009).

✓ **Proline.** Elle agit sur la stabilisation des protéines et des membranes, l'acidité du cytosol, sert de réserve en C et N et est impliquée dans le processus de détoxification des FAOs. Son accumulation est due à une augmentation de sa synthèse et une diminution de sa dégradation (Ruelland *et al.*, 2009 ; Theocharis, 2010).

✓ **Glycine bétaine.** Elle permet de réduire la diminution de l'activité photosynthétique du photosystème II (PSII), stabilise la transcription et la traduction et induit l'expression d'enzymes antioxydantes (Ruelland *et al.*, 2009).

✓ **Polyamines** dont le rôle est de protéger les fonctions du photosystème, des **systèmes de détoxification des FAOs** (catalases, superoxyde dismutases, ascorbate peroxydase, vitamine E) et des **pigments photosynthétiques** (xanthophylles et anthocyanines ; Ruelland *et al.*, 2009).

## 2.5-Les molécules de signalisation

Les molécules de signalisation interviennent dans la signalisation intercellulaire (Fig. 5), c'est-à-dire qu'elles vont diffuser le signal émis par la cellule stressée aux cellules voisines et même au reste de la plante.

Les principales molécules impliquées dans les mécanismes de résistance sont l'**AS**, l'**AJ** et l'**ET** (Fig. 12 ; Pieterse & van Loon, 1999 ; Glazebrook, 2001 ; Thomma *et al.*, 2001). L'acide abscissique (**ABA**), les brassinostéroïdes (**BR**), les cytokinines (**CK**), les gibbérellines (**GA**) et/ou l'auxine (**AIA** : **acide indole-3-acétique**) peuvent également intervenir dans la résistance mais leur rôle n'est pas encore bien défini car moins étudié (Pieterse & van Loon, 2007 ; Lopez *et al.*, 2008 ; Shah, 2009). Le rôle de ces différentes hormones dans les réponses de défense a récemment été décrit par Bari & Jones (2009) et leurs implications en réponse à des agents pathogènes sont résumées dans la Fig. 13.

### 2.5.1-L'acide salicylique (AS)

Chez les végétaux, 2 voies de biosynthèse sont responsables de la production d'AS (Fig. 14). L'AS peut être synthétisé par la voie des phénylpropanoïdes *via* la PAL et/ou à

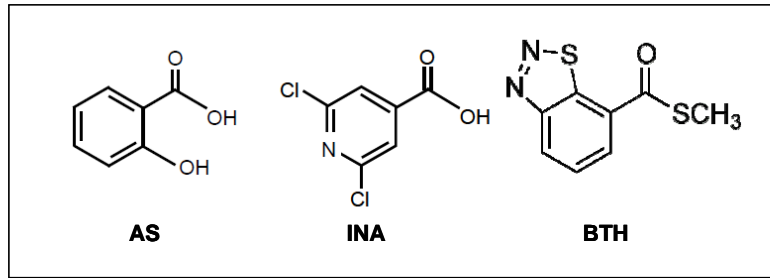


Fig. 15 : Structures chimiques des analogues de l'acide salicylique (AS). BTH : ester S-méthyl de l'acide benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioïque ; INA : acide 2,6-dichloroisonicotinique.

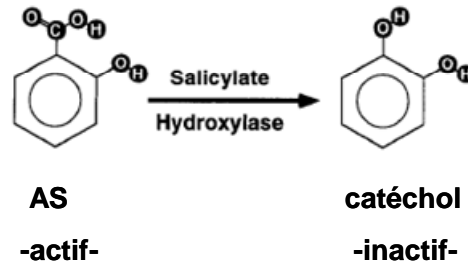


Fig. 16 : Conversion de l'acide salicylique (AS) en catéchol chez des plantes transgéniques possédant le gène *NahG* codant la salicylate hydroxylase.

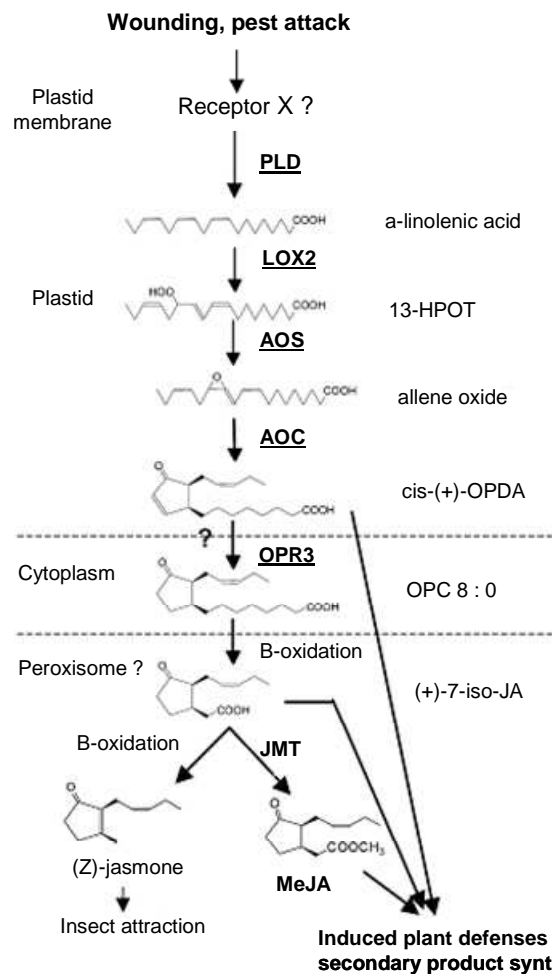


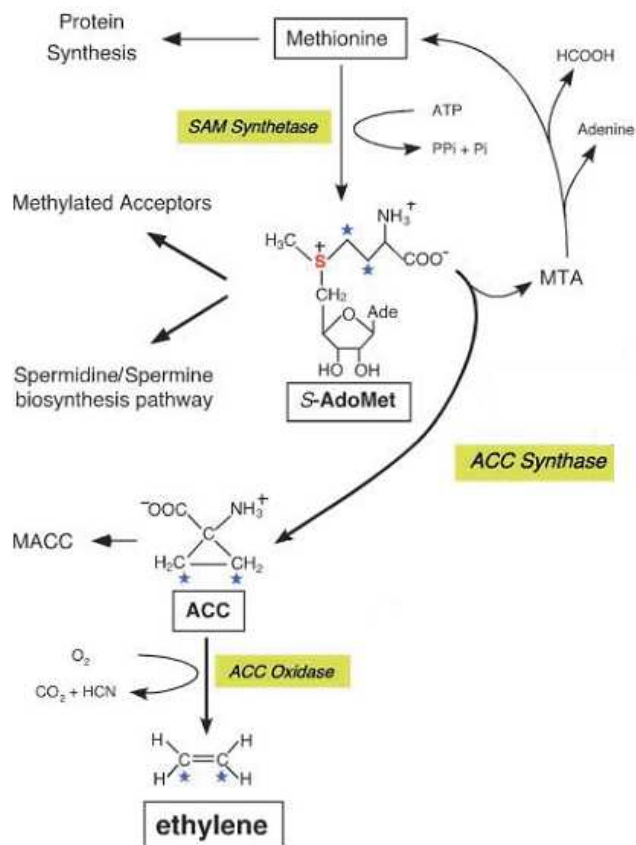
Fig. 17 : Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (JA). PLD : phospholipase ; LOX : lipoxygénase ; AOS : allène oxyde synthase ; AOC : allène oxyde cyclase ; OPR3 : acide 12-oxo-phytyldiénoïque (OPDA) réductase ; JMT : S-adénosyl-L-méthionine/acide jasmonique carboxyl méthyltransférase ; MeJA : méthyl jasmonate (Devoto & Turner, 2003).

partir du chorismate *via* l'isochorismate synthase (Fig. 14). La concentration en AS augmente significativement localement et dans les parties systémiques en réponse à une infection par un agent pathogène d'origine fongique, bactérienne ou virale (Ryals *et al.*, 1996). De plus, l'application exogène d'AS ou de l'un de ses analogues (**INA** : acide 2,6-dichloroisonicotinique, **BTH** : ester S-méthyl de l'acide benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioïque ; Fig. 15) active la résistance locale et la SAR ('systemic acquired resistance', cf paragraphe 2.6.1) en réponse à des agents pathogènes biotrophes (Grant & Lamb, 2006). Par ailleurs, des mutants ou des plantes transgéniques d'*A. thaliana* affectés négativement dans l'accumulation d'AS ou qui y sont insensibles sont plus sensibles aux attaques d'agents pathogènes que les plantes sauvages : **NPR1** ('non-expressor of **PR-1**'), **EDS1** ('enhanced disease susceptibility' type 1), **PAD4**, **SID** ('salicylic-acid-induction deficient'), **NahG** ('salicylate hydroxylase' ; Nawrath & Métraux, 1999 ; Glazebrook, 2001 ; Dong, 2004). Par exemple, des plants de tabac et d'arabette sur-exprimant le gène *NahG* (codant une salicylate hydrolase, enzyme bactérienne de dégradation de l'AS en catéchol ; Fig. 16) montrent une très faible induction des gènes *PR*, une résistance locale amoindrie et une incapacité à mettre en place la SAR (Delaney *et al.*, 1994 ; Mellersh & Heath, 2003 ; van Wees & Glazebrook, 2003). Thomma *et al.* (2001) ont démontré que l'accumulation d'AS en local et systémique est nécessaire à l'expression de plusieurs gènes *PR* chez l'arabette, notamment *PR-1*, *PR-2* et *PR-5*.

Chez la vigne, Busam *et al.* (1997) ont démontré qu'une application d'AS stimule l'accumulation de protéines *PR* sur des cultures cellulaires, celle-ci étant également observée sur les racines, feuilles, tiges et baies (Renault *et al.*, 1996 ; Derckel *et al.*, 1996 & 1998).

### **2.5.2-L'acide jasmonique (AJ)**

Les différentes formes de jasmonates sont synthétisées *via* la voie des octadécanoïdes (Fig. 17). L'accumulation d'AJ dans les plantes en réponse à une blessure ou un traitement par des éliciteurs peut être bloquée par des inhibiteurs de la lipoxygénase (**LOX** ; Doares *et al.*, 1995), montrant que la LOX joue un rôle essentiel dans la biosynthèse de l'AJ. Si l'AJ est un produit terminal de cette voie, des intermédiaires ainsi que des dérivés sont également biologiquement actifs, comme le MeJA ou son précurseur, l'acide 12-oxo-phytodienoïque (**OPDA** ; Turner *et al.*, 2002). L'AJ est aussi impliqué dans divers processus développementaux tels que la germination des graines, la croissance racinaire, la sénescence foliaire, l'ouverture des stomates (Bari & Jones, 2009).



**Fig. 18 :** Voie de biosynthèse de l'éthylène. ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique ; SAM : S-AdoMet ; ROS : formes actives de l'oxygène ; MACC : malonyl-ACC ; MTA : 5'-méthylthioadénosine (schéma simplifié de Wang *et al.*, 2002).

L'AJ est habituellement associé aux réponses contre les agents pathogènes nécrotrophes et les insectes herbivores (Bari & Jones, 2009), ainsi qu'aux traitements par des PGPRs ('Plant Growth-Promoting Rhizobacterium', cf paragraphe 2.6.2). Il a été démontré que la synthèse des PR-3, PR-4, PDF1.2 (défensine, PR-12) et PDF2.2 (thionine, PR-13) était dépendante de la voie de l'AJ (Thomma & Broekaert, 1998 ; Thomma *et al.*, 2001). Les triples mutants *fad3-fad7-fad8* ('fatty acid desaturase') et les mutants **OPR3** ('OPDA réductase'), déficients dans la production d'AJ, ainsi que les mutants **Coil** ('coronatine insensitive' type 1), **JAR-1** ('jasmonic acid-resistant' type 1) et **JIN1** ('jasmonic acid-insensitive' type 1), incapables de percevoir l'AJ, sont plus sensibles aux attaques par des insectes herbivores et des champignons nécrotrophes comme *B. cinerea*, *Alternaria brassicicola* ou *Pythium* sp. (Staswick *et al.*, 1998 ; Thomma *et al.*, 1998 ; Vijayan *et al.*, 1998 ; Norman-Setterblad *et al.*, 2000 ; Glazebrook, 2001 ; Truman *et al.*, 2007). En revanche, la sur-expression de l'AJ-carboxyl méthyl transférase, permettant l'augmentation des taux de MeJA, se traduit par une meilleure résistance envers *B. cinerea* (Seo *et al.*, 2001). L'ajout de MeJA exogène restaure d'ailleurs la résistance des plantes mutantes déficientes dans la synthèse de l'AJ (Thomma *et al.*, 1998). Cependant, tous les insectes herbivores n'activent pas la signalisation *via* l'AJ chez les plantes (Kempema *et al.*, 2007). Chez la vigne, le MeJA induit l'expression de *PR-1*, *PR-2*, *PR-8*, *PAL*, *PIN* (inhibiteur de protéase, PR-6) et *Chit4C* (Repka, 2001 ; Repka *et al.*, 2004 ; Belhadj *et al.*, 2008b ; Faurie *et al.*, 2009), la production de phytoalexines (Faurie *et al.*, 2009) et d'AS (Belhadj *et al.*, 2008b) sur cultures cellulaires, ainsi qu'une accumulation de callose chez les plantes (Belhadj *et al.*, 2006).

### **2.5.3-L'éthylène (ET)**

L'ET est une molécule volatile dérivant de la méthionine (Fig. 18) impliquée dans plusieurs processus physiologiques (abscission, germination, floraison et sénescence, nodulation racinaire, mort cellulaire programmée) et dans les réponses de défense (Penninckx *et al.*, 1998 ; Bleecker & Kende, 2000 ; Panter & Jones, 2002 ; Broekaert *et al.*, 2006). Suite à des attaques par des agents pathogènes, des insectes ou suite à des blessures, il s'accumule en grande quantité surtout au niveau du site d'infection et il est également impliqué dans la synthèse de PDF1.2 (Thomma *et al.*, 2001). Chez l'arabette, des mutants *ein2* ('éthylène insensitive' type 2) sont plus sensibles que les plantes sauvages lors d'attaques par des agents pathogènes tels que *B. cinerea*, *E. carotovora*, *Septoria glycines* et *Rhizoctonia solani*

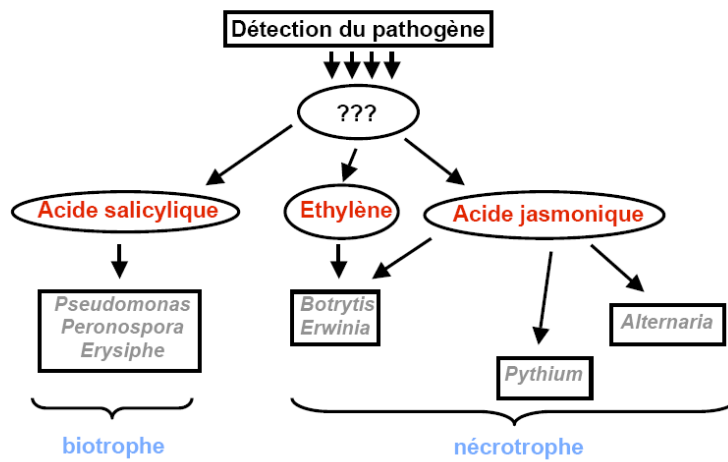


Fig. 19 : Implication des principales voies de signalisation dans la résistance aux agents pathogènes chez *A. thaliana* (d'après Thomma *et al.*, 2001).



(Hoffman *et al.*, 1999 ; Thomma *et al.*, 1999a ; Norman-Setterblad *et al.*, 2000). De plus, des plants de tabac *etr1-1* ('ethylene receptor') sont devenus sensibles à *Pythium sylvaticum* alors que ce champignon est normalement non-pathogène (Knoester *et al.*, 1998). Ainsi, une diminution du taux d'ET semble donc accroître la susceptibilité des plantes aux agents pathogènes. Pourtant, dans d'autres cas, cette diminution augmente la résistance des plantes envers *P. syringae* pv. *glycinea* et *Phytophthora sojae* (Hoffman *et al.*, 1999). À notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'implication de l'ET dans l'établissement des réponses de défense de la vigne.

En conclusion, on observe que les voies indépendantes de l'AS impliquent les voies de l'AJ et/ou de l'ET. L'infection par un agent pathogène biotrophe provoque principalement une activation de la voie de l'AS. En revanche, les réponses induites par l'AJ et/ou l'ET sont généralement activées soit après l'infection par un agent pathogène nécrotrophe, une blessure ou un traitement par une PGPR. Ainsi, selon la nature de l'agent inducteur, les composés de défense mis en place seront différents (Fig. 19 ; Thomma *et al.*, 1998 ; Govrin & Levine, 2000 ; McDowell & Dangl, 2000 ; Glazebrook, 2005 ; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007 ; Lopez *et al.*, 2008).

#### **2.5.4-Les autres molécules de signalisation**

L'**AIA**, outre son effet positif sur la rhizogénèse, induit l'expression de trois groupes de gènes : *Aux/IAA*, *GH3* (codant des AIA-amino synthases) et **SAUR** ('small auxin up RNA' ; Woodward & Bartel, 2005). Il régule l'expression de gènes associés à la biosynthèse ou le catabolisme et la signalisation d'autres hormones (Papanov *et al.*, 2008). L'AIA est impliquée dans la résistance mais aussi dans la sensibilité des plantes lors de stress biotiques, son rôle étant fonction du pathosystème considéré (Spaepen *et al.*, 2007 ; Kazan & Manners, 2009). Par exemple, un traitement préventif de l'arabette par de l'AIA favorise l'apparition de la maladie en présence d'*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi* et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (**Pst DC3000** ; Bari & Jones, 2009). En revanche, la répression de cette voie de signalisation affecte sa résistance contre *Plectosphaerella cucumerina* et *B. cinerea* (Llorente *et al.*, 2008).

L'**ABA** est impliqué dans divers aspects de la croissance et du développement des plantes : germination, maturation embryonnaire, sénescence foliaire, fermeture des stomates



et adaptation aux stress environnementaux (Wasilewskaa *et al.*, 2008). Dans la plupart des cas, l'ABA a un effet négatif sur la régulation des défenses de la plante lors de stress biotiques, qu'il s'agisse d'agents pathogènes de nature biotrophe ou nécrotrophe (Lopez *et al.*, 2008 ; Bari & Jones, 2009). Ainsi, il sensibilise *A. thaliana* vis-à-vis de la bactérie virulente *Pst* DC3000 (de Torres-Zabala *et al.*, 2007) mais augmente la résistance d'*A. thaliana* face à *Ralstonia solanacearum* et *Pythium irregulare* (Adie *et al.*, 2007 ; Hernandez-Blanco *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'ABA active la fermeture des stomates, ce qui réduit certaines infections bactériennes ou fongiques (champignons nécrotrophes), les stomates pouvant être une voie de pénétration dans la plante pour ces agents pathogènes (Ton & Mauch-Mani, 2004 ; Mauch-Mani & Mauch, 2005 ; Melotto *et al.*, 2006 ; Jalloul *et al.*, 2009). Il est également impliqué dans le dépôt de callose, la production de FAOs et la régulation de l'expression de gènes de défense (Bari & Jones, 2009 ; Jalloul *et al.*, 2009).

Les **GA** favorisent la croissance des plantes par la stimulation de la dégradation des protéines DELLA, ces dernières induisant l'expression de gènes codant des enzymes de détoxification des FAOs (catalases et peroxydases), régulant ainsi les taux de FAOs lors de stress (Achard *et al.*, 2008). Les GA confèrent à la plante une résistance contre les agents pathogènes biotrophes mais augmentent sa sensibilité lors d'attaques par des agents nécrotrophes. Ainsi, un traitement aux GA augmente la résistance de l'arabette face à *Pst* DC3000 et sa sensibilité face à *A. brassicicola* (Bari & Jones, 2009).

Les **CK** sont impliquées dans la différenciation vasculaire, la balance en nutriments, la croissance des racines, tiges et inflorescences, la sénescence foliaire (Muller & Sheen, 2007). Leur rôle dans les mécanismes de défense est peu connu mais il semble qu'elles soient impliquées dans les réponses mises en place chez l'arabette lorsque celle-ci est attaquée par *Plasmodiophora brassicae* : une régulation négative des gènes gouvernant leur homéostasie a été rapportée (Siemens *et al.*, 2006). Tout comme l'AIA, les CK sont capables de bloquer la traduction des ARNm de certaines protéines PR comme la  $\beta$ -glucanase et la chitinase (Spaepen *et al.*, 2007).

Les **BR** sont impliqués dans divers processus physiologiques (germination, division cellulaire, élongation, floraison, sénescence), ainsi que dans les réponses induites à la suite de stress abiotiques (Bajguz, 2007). Plusieurs études ont été menées afin de déterminer s'ils interviennent dans les mécanismes de défense lors de stress biotiques. Nakashita *et al.* (2003)

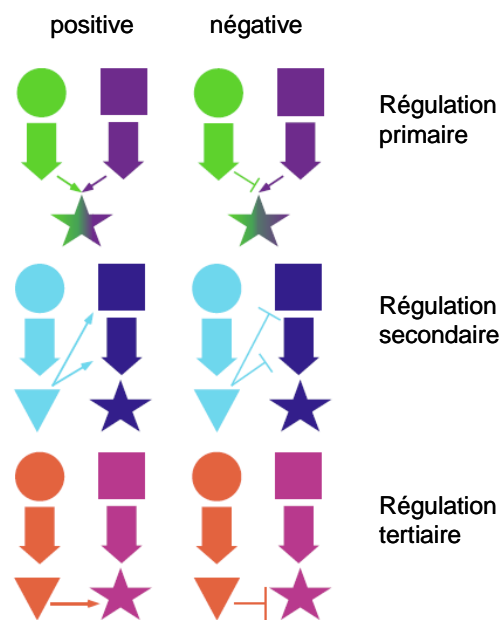


Fig. 20 : Les différents concepts d'interconnexion entre les voies de signalisation (d'après Kuppusamy *et al.*, 2009).

ont démontré que les BR induisent la résistance chez des plants de riz infectés par *Xanthomonas oryzae*, celle-ci n'étant liée ni à la synthèse et la signalisation par l'AS ni à la production de protéines PR.

À notre connaissance, l'implication de l'AIA, l'ABA, des CK, des GA et des BR dans les mécanismes de défense de la vigne n'ont pas été déterminés à ce jour.

Il apparaît clairement aujourd'hui que les différentes molécules de signalisation intercellulaire peuvent être inter-reliées et qu'une combinaison de signaux affecte l'expression d'un spectre particulier de gènes cibles. Ces associations de signaux, positives ou négatives, permettent d'augmenter les possibilités de régulation et d'apporter une réponse adaptée à des agressions différentes.

### **2.5.5-Interconnexions entre les voies de signalisation**

Les mécanismes de régulation de la balance hormonale ont récemment été décrits par Kuppusamy *et al.* (2009). Les interactions peuvent se faire selon trois modèles (Fig. 20) :

✓ **Régulation primaire.** Ce concept est peu présent chez les plantes. Il s'agit de deux voies distinctes qui ont pour produit final la même molécule signal. Le meilleur exemple de régulation primaire positive est l'interaction entre l'AJ et l'ET.

✓ **Régulation secondaire.** Elle consiste dans le fait qu'une voie de signalisation régule les taux ou la perception des molécules transitoires d'une seconde voie.

✓ **Régulation tertiaire.** Dans ce cas, ce sont les produits finaux de deux voies distinctes qui interagissent ensemble.

De nombreuses études indiquent que l'AJ et l'ET agissent en synergie pour activer l'expression de gènes de défense à la suite d'une infection (Penninckx *et al.*, 1998 ; Schenk *et al.*, 2000 ; Thomma *et al.*, 2001 ; Glazebrook, 2005). Chez *A. thaliana*, l'expression de *PDF1.2* nécessite la synthèse concomitante de l'ET et l'AJ mais est indépendante de l'AS (Penninckx *et al.*, 1998). Les doubles mutants *coi1-ein2* sont plus sensibles lors d'infections par les champignons nécrotrophes *A. brassicicola* et *B. cinerea*, mais pas par *P. parasitica* (Penninckx *et al.*, 1998 ; Thomma *et al.*, 1999a & 2001).



D'autres études ont démontré l'existence d'un antagonisme entre les voies dépendantes de l'AS et de l'AJ/ET au cours des réponses de défense (Doares *et al.*, 1995 ; Mur *et al.*, 2006). Plusieurs protéines sont impliquées dans l'antagonisme entre l'AS et l'AJ : NPR1 qui est responsable de l'induction des protéines PR dépendantes de l'AS (Spoel *et al.*, 2007 ; Jalloul *et al.*, 2009) et les facteurs de transcription WRKY, notamment WRKY53, WRKY70 et WRKY62 (Bari & Jones, 2009). NPR1 est un régulateur clé de la voie de signalisation dépendante de l'AS. Chez *A. thaliana*, il contrôle directement l'expression de certains facteurs WRKY (Wang *et al.*, 2006a). De plus, la présence de W-box dans son promoteur suggère que son expression elle-même est sous la dépendance de certains facteurs WRKY (Yu *et al.*, 2001). Spoel *et al.* (2003) ont démontré que NPR1 est impliqué dans l'inhibition de la voie de signalisation dépendante de l'AJ par l'AS chez *A. thaliana*. La sur-expression de *WRKY70* (dont l'expression est contrôlée par NPR1 chez les plantes sauvages) stimule l'expression des gènes codant des protéines PR dépendantes de l'AS et réprime fortement celles des gènes codant des protéines PR dépendantes de l'AJ (Li *et al.*, 2004). Cependant, *WRKY33*, indépendant de NPR1, contrôle la résistance vis-à-vis des agents pathogènes nécrotrophes en activant les gènes de la voie dépendante de l'AJ et en réprimant ceux dépendants de la voie de l'AS (Zheng *et al.*, 2006). Toutefois, NPR1 (lors d'une attaque par un insecte herbivore) et MPK4 inhibent la voie dépendante de l'AS pour permettre l'activation de celle dépendante de l'AJ chez l'arabette (Petersen *et al.*, 2000 ; Bari & Jones, 2009). Des plants d'*A. thaliana* prétraités par de l'AS sont plus sensibles aux attaques d'*A. brassicicola*, alors que les mutants *sid2*, incapables d'accumuler l'AS, sont plus résistants à ses attaques (Spoel *et al.*, 2007). Des preuves d'interactions synergiques ont également été rapportées (Kunkel & Brooks, 2002 ; Beckers & Spoel, 2006 ; Mur *et al.*, 2006). Par exemple, le MeJA induit la synthèse d'AS sur des cultures cellulaires de vigne (Repka *et al.*, 2004 ; Belhadj *et al.*, 2008b). Les relations entre l'AS et l'ET sont en revanche plus obscures. Chez *A. thaliana*, des analyses par microarrays suggèrent une action potentialisatrice de l'ET sur l'induction de *PR1* dépendante de l'AS, alors qu'une approche génétique démontre l'inverse (Jalloul *et al.*, 2009). Des plants *NahG* et des mutants *pad4* d'*A. thaliana* produisent cependant moins d'ET lors de l'interaction arabette-*Pst* comparés aux plantes sauvages (Heck *et al.*, 2003).

Récemment mis en évidence dans les mécanismes de défense, l'ABA interagit avec les autres voies de signalisation. Son rôle dans l'établissement de la résistance dépend de la nature de l'agent pathogène, de son mode de pénétration, du temps nécessaire à la mise en

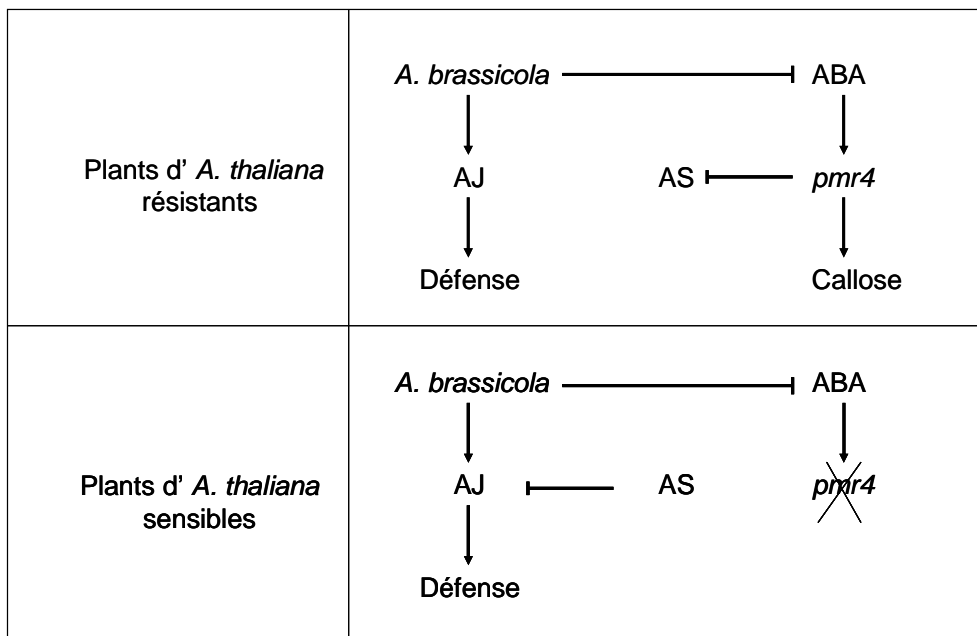


Fig. 21 : Signalisation de la résistance chez *A. thaliana* infectée par *Alternaria brassicicola*. ABA : acide abscissique ; AJ : acide jasmonique ; AS : acide salicylique ; *pmr4* : gène codant la callose synthase (d'après Jalloul *et al.*, 2009).



place des réponses de défense et de la nature du tissu infecté (Ton *et al.*, 2009). Dans la plupart des cas, l'ABA régule négativement les mécanismes de défense. L'existence d'un antagonisme entre l'ABA et les voies dépendantes de l'AJ et de l'ET a été clairement démontrée. Ces dernières sont stimulées dans des mutants déficients en ABA, alors qu'un traitement des plantes par de l'ABA exogène réduit la transcription de gènes dépendants de l'AJ et de l'ET (Anderson *et al.*, 2004 ; Flors *et al.*, 2008). Par exemple, dans l'interaction *A. thaliana*-*Pythium irregulare*, l'ABA affecte la production d'AJ, ce qui accroît la sensibilité de la plante (Adie *et al.*, 2007). Il existe également une relation entre l'ABA, l'AS et l'AJ. Chez *A. thaliana*, *A. brassicicola* inhibe la synthèse d'ABA. Or le gène de la callose synthase *pmr4*, sous contrôle de l'ABA, inhibe la voie de l'AS permettant ainsi à celle de l'AJ de contribuer à la résistance de la plante contre ce champignon. En revanche, dans des mutants affectés dans l'expression de *pmr4*, l'AS, dont l'inhibition est levée, régule négativement la voie de l'AJ ce qui déclenche le processus de sensibilité à cet agent pathogène (Fig. 21 ; Flors *et al.*, 2008).

Les interconnexions avec les autres hormones (CK, BR, GA, AIA) sont moins connues dans la mesure où leurs implications dans les mécanismes de défense sont encore peu étudiées. Cependant, de récentes études ont démontré que ces molécules de signalisation pouvaient interférer avec l'AS, l'AJ et l'ET. Chez le riz, des mutants sur-exprimant le gène *GH3.8* montrent une diminution de l'expression des gènes liés à l'AS et l'AJ lors d'attaques par *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ding *et al.*, 2008). Il a été démontré que le BTH (analogue de l'AS) réprime l'expression d'un grand nombre de gènes dépendants de l'AIA dans les tissus après la mise en place de la SAR (Wang *et al.*, 2007). Les GA modulent les réponses dépendantes de l'AS et l'AJ via les protéines DELLA (Navarro *et al.*, 2008). Chez la pomme de terre, les BR protègent contre *Phytophthora infestans*, cette résistance étant associée à l'augmentation des taux d'ABA et d'ET (Krishna, 2003). Elles induisent également l'expression des gènes codant l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) synthase (impliquée dans la synthèse d'ET) et OPR3 (voie de l'AJ) chez l'arabette (Yi *et al.*, 1999 ; Muessig *et al.*, 2006). L'AIA, les GA, l'ABA, l'AJ et les CK sont impliqués dans la modulation des réponses dépendantes de l'ET (Stepanova & Alonso, 2005).

Enfin, certains micro-organismes pathogènes ont la capacité de synthétiser eux-mêmes quelques unes de ces hormones, comme l'AIA ou encore l'AS, ce qui influence les défenses mises en place par l'hôte (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007 ; Spaepen *et al.*, 2007).



À notre connaissance, chez la vigne, les interconnexions entre toutes les molécules de signalisation, à l'exception de l'interaction positive entre le MeJA et l'AS (Repka *et al.*, 2004 ; Belhadj *et al.*, 2008b), ne sont pas connues du fait de l'impossibilité d'utiliser des mutants.

## **2.6-Les résistances systémiques**

La SAR et l'ISR sont les deux types de résistance systémique mis en place par la plante à la suite d'un stress. Jusqu'à récemment, il était généralement admis que la SAR était dépendante de la voie de l'AS et l'ISR de la voie AJ/ET (Pieterse & van Loon, 2007). Cependant, de récentes études démontrent que ce concept doit être modulé (Truman *et al.*, 2007 ; Van der Ent *et al.*, 2009). En effet, il serait plus exact de définir la SAR comme la résistance systémique mise en place par la plante à la suite d'une attaque par un agent pathogène, et que l'ISR est celle mise en place par la plante en réponse à la présence de micro-organismes bénéfiques.

### **2.6.1-La SAR**

Après une première infection, la SAR conduit à la protection systémique de la plante vis-à-vis de nouvelles infections. Elle permet ainsi de protéger les différents organes de la plante contre un stress ultérieur. Son activité protectrice peut durer plusieurs semaines après le premier contact entre la plante et l'agent pathogène (van Loon *et al.*, 2006b).

#### **2.6.1.1-Voie de signalisation dépendante de l'AS**

Le déclenchement de la SAR est souvent associé à une augmentation des niveaux en AS. L'importance de l'AS dans la SAR a été démontrée par l'utilisation de plantes transgéniques *NahG*. Différentes études menées sur des plants de tabac ou d'*A. thaliana* ont révélé que les plantes *NahG* sont plus sensibles à une seconde attaque par des agents pathogènes d'origine fongique, bactérienne et virale (Delaney *et al.*, 1994 ; Kachroo *et al.*, 2000). D'autres mutants perturbés dans l'accumulation d'AS (*sid1*, *sid2*) ont également montré une sensibilité accrue à *Hyaloperonospora parasitica* après un premier contact avec *Pst* DC3000 (Nawrath & Métraux, 1999). Récemment, il a été démontré que le méthyl-

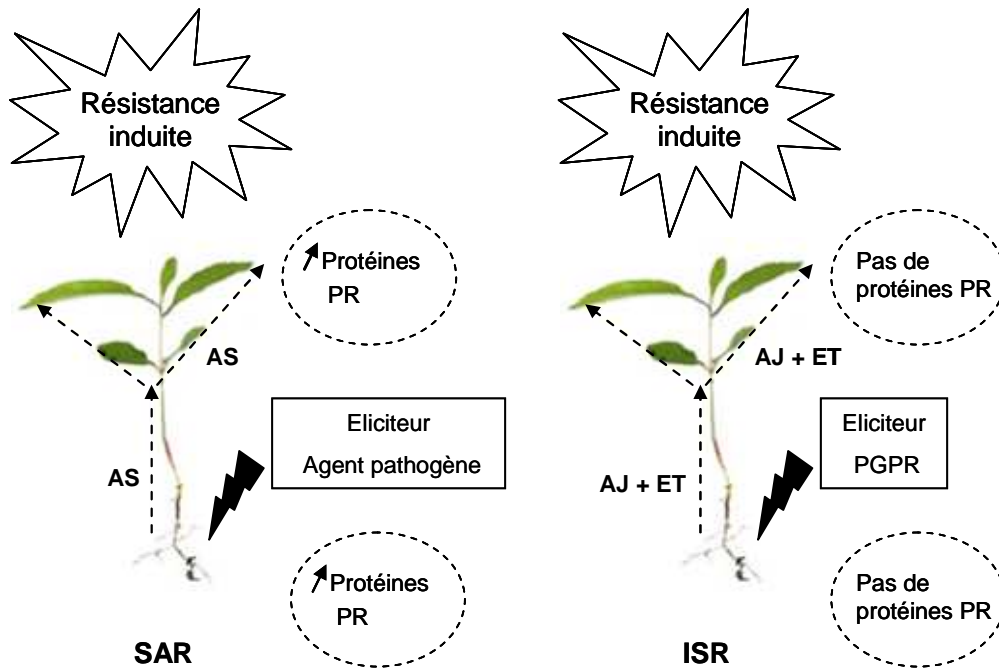


Fig. 22 : La résistance systémique (SAR et ISR) selon van Loon *et al.* (2006b), schéma modifié de Vallad & Goodman (2004). AJ : acide jasmonique ; AS : acide salicylique ; ET : éthylène ; ISR : résistance systémique induite ; PGPR : plant growth-promoting rhizobacterium ; PR : pathogenesis-related ; SAR : résistance systémique acquise.

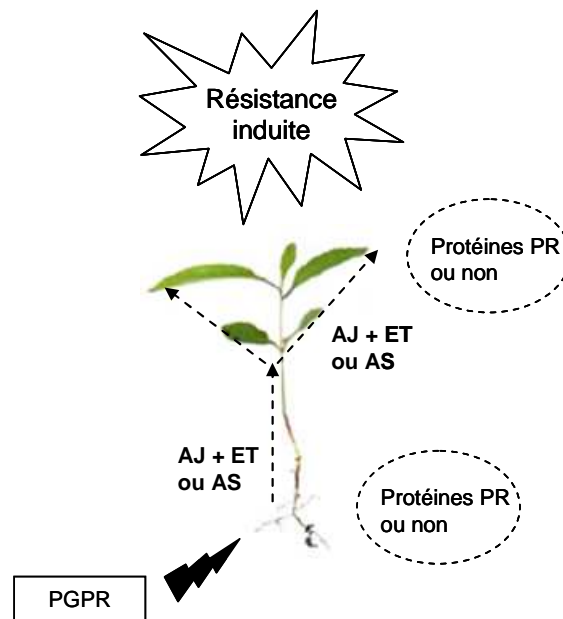


Fig. 23 : La mise en place de la résistance systémique induite (ISR) par des PGPRs (plant growth-promoting rhizobacterium). AJ : acide jasmonique ; AS : acide salicylique ; ET : éthylène ; PR : pathogenesis-related.

salicylate agissait comme un signal mobile inducteur de la SAR chez le tabac (Park *et al.*, 2007).

### 2.6.1.2-Implication de l'AJ et de l'ET

Contrairement au modèle établi par van Loon *et al.* (2006b), la SAR peut également faire intervenir l'AJ et l'ET. Par exemple, les mutants *opr3* et *jin1* sont incapables d'induire la SAR après l'infiltration des feuilles par une souche avirulente de *Pst* (Truman *et al.*, 2007). En revanche, lors d'attaques par d'autres agents pathogènes, des mutants ne percevant plus l'AJ (*jar1*, *eds8* et *coil*) ne sont pas affectés dans l'expression de la SAR (Pieterse *et al.*, 1998 ; Ton *et al.*, 2002 ; Attaran *et al.*, 2009). L'implication de l'ET dans la SAR est moins étudiée. Chez le tabac, Verberne *et al.* (2003) ont démontré que la perception de l'ET par la plante est nécessaire pour l'établissement de la SAR dépendante de l'AS après contact avec le virus de la mosaïque du tabac.

### 2.6.2-L'ISR

Dans le modèle établi par van Loon *et al.* (2006b) et van Loon (2007), basé sur l'interaction entre la PGPR WCS417r et l'arabette, l'AS est décrit comme la molécule de signalisation impliquée dans les mécanismes de la SAR, tandis que l'AJ et l'ET sont impliqués dans l'ISR, la production de protéines PR n'étant observée que pour la SAR (Fig. 22). Mais ces dernières années, l'utilisation de mutants chez *A. thaliana* a permis de démontrer que ces hormones peuvent être impliquées dans la SAR mais aussi dans l'ISR (Fig. 23 ; Pieterse & van Loon, 2007 ; Van der Ent *et al.*, 2009).

#### 2.6.2.1-Voies de signalisation dépendantes de l'AJ et l'ET

L'existence d'une résistance systémique autre que la SAR a été démontrée par les différentes études menées sur la bactérie *Pseudomonas fluorescens* souche WCS417r. Chez le radis, cette PGPR (*cf* paragraphe 3.2.4) confère une protection contre *Fusarium* sp. sans accumulation de protéines PR (Hoffland *et al.*, 1995). De même, des études approfondies menées sur l'interaction *A. thaliana*-WCS417r ont démontré que cette ISR n'était associée ni à une accumulation de protéines PR ni d'AS dans les feuilles, les plantes *NahG* développant une ISR similaire aux plantes sauvages (Pieterse *et al.*, 1996 & 2000). Les mécanismes



impliqués entre la souche WCS417r et ses plantes hôtes ont été récemment décrits par Pieterse & van Loon (2007). L'ISR induite par WCS417r ne s'exprime pas chez les mutants *ein 2*, *jar1*, *jin1*, *eds8* et *coi1* (Pieterse *et al.*, 1998 ; Knoester *et al.*, 1999; Ton *et al.*, 2002 ; Pozo *et al.*, 2008). De nombreuses études démontrant l'existence d'une voie de signalisation indépendante de l'AS dans la mise en place de l'ISR chez *A. thaliana* par des PGPRs ont été publiées ces dernières années (Pieterse *et al.*, 1996 ; Pieterse & van Loon, 1999 ; Iavicoli *et al.*, 2003 ; Ryu *et al.* 2003 & 2004 ; Stein *et al.*, 2008 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2009). Cette voie intervient également dans les interactions concombre-*Trichoderma asperellum* (Shoresh *et al.*, 2005), riz-*Pseudomonas fluorescens* WCS374r (De Vleeschauwer *et al.*, 2008), tomate-*Bacillus pumilus* SE34 ou -*P. fluorescens* 89B61 ou -*Pythium oligandrum* (Yan *et al.*, 2002 ; Hase *et al.*, 2008).

#### 2.6.2.2-Voie de signalisation dépendante de l'AS

Bien que la majorité des études sur les interactions entre les micro-organismes bénéfiques et leurs plantes hôtes met en évidence l'importance des voies de signalisation dépendantes de l'AJ et de l'ET dans l'ISR, certaines interactions ont révélé l'existence d'une voie dépendante de l'AS. Par exemple, la bactérie *P. aeruginosa* 7NSK2, productrice d'AS, induit l'ISR chez des plants sauvages de tabac alors qu'elle en est incapable chez les plantes *NahG* (De Meyer *et al.*, 1999). De même, chez l'arabette, *Paenibacillus alvei* K165 est incapable d'induire une ISR contre *Verticillium dahliae* chez les mutants *eds5/sid1* et *sid2*, contrairement aux plants sauvages (Tjamos *et al.*, 2005). *Bacillus subtilis* FB17 induit une résistance envers *Pst* via une accumulation d'AS et l'induction de l'expression de *PR-1* (gène marqueur de la voie de signalisation de l'AS ; Rudrappa *et al.*, 2008). Conn *et al.* (2008) ont démontré que *Streptomyces* sp. EN27 induit une résistance contre *Erwinia carotovora* et *Fusarium oxysporum* via la voie de l'AS. De même, *Stenotrophomonas* sp. N6.8 induit une accumulation plus importante d'AS lorsque la plante est attaquée par *Xanthomonas campestris* CECT 95 (Domenech *et al.*, 2007). Enfin, certains micro-organismes induisant l'ISR sont capables de produire, en présence d'une faible teneur en fer dans le milieu, de l'AS comme sidérophore (*cf* paragraphe 3.2.4.3.c), ce dernier agissant dès-lors comme un éliciteur des mécanismes de défense de la plante et activant la voie dépendante de l'AS (Pieterse & van Loon, 2007).





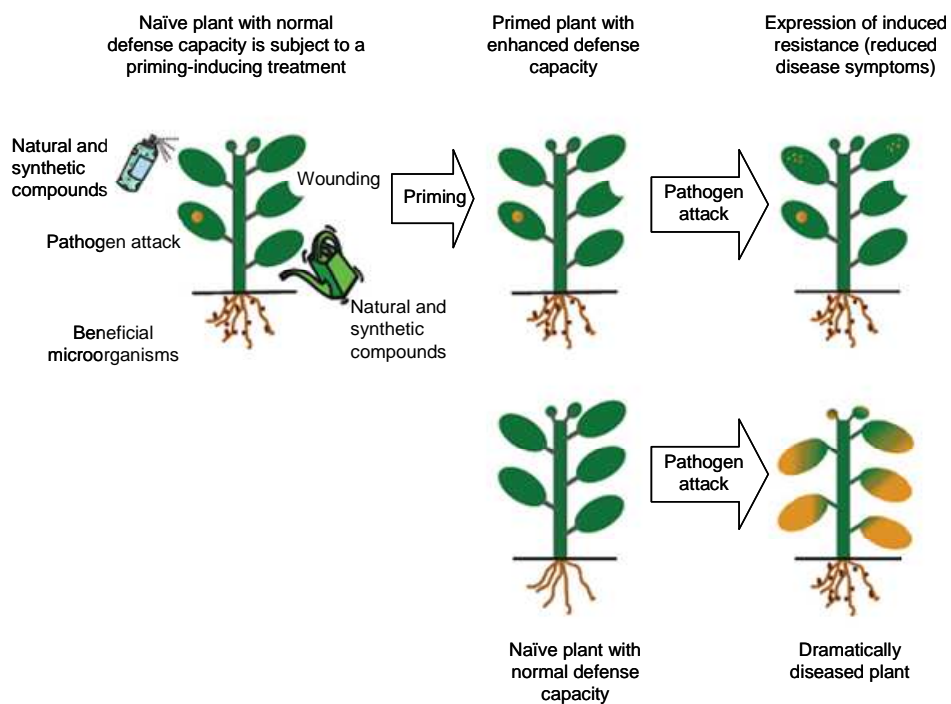
### 2.6.2.3-Les protéines PR dans l'ISR

L'accumulation des protéines PR dans la SAR est bien établie (Ryals *et al.*, 1996 ; van Loon & Strien, 1999 ; van Loon *et al.*, 2006b). En revanche, leur implication dans l'ISR est controversée. Il a été décrit que la colonisation de la tomate, du radis et de l'arabette par *P. fluorescens* WCS417r, du concombre par *Bacillus subtilis* souche M4 et de la tomate par *F. oxysporum* Fo47 n'est pas associée avec l'accumulation de protéines PR en l'absence d'un agent pathogène (Hoffland *et al.*, 1995 ; Pieterse *et al.*, 1996 ; Duijff *et al.*, 1998 ; van Loon *et al.*, 1998 ; Ongena *et al.*, 2005a ; Aimé *et al.*, 2008). Néanmoins, d'autres études ont démontré l'induction locale et systémique de gènes codant des protéines PR lors de la colonisation racinaire par une PGPR ou un micro-organisme non pathogène. Par exemple, chez l'arabette, *P. thivarlensis* souche MLG45 et *Paenibacillus polymyxa* induisent respectivement l'expression de chitinases et de *PR-1* (Timmusk & Wagner, 1999 ; Cartieaux *et al.*, 2003). Chez le tabac, *P. fluorescens* souche CHAO induit l'expression de gènes codant une *PR-1*, une glucanase et une endochitinase au niveau foliaire (Maurhofer *et al.*, 1994).

Le modèle proposé par van Loon *et al.* (2006b ; Fig. 22) ne s'applique donc pas à tous les pathosystèmes. Il semblerait qu'à chaque système plante-agent pathogène et plante-micro-organisme bénéfique-agent pathogène corresponde un dispositif de défense particulier. La SAR et l'ISR peuvent faire intervenir la protéine NPR1. La différence est que la cible de cette protéine est nucléaire dans le contexte de la SAR, tandis qu'elle est cytosolique pour l'ISR (Pieterse & van Loon, 2007 ; Van der Ent *et al.*, 2009). Néanmoins, ces deux résistances systémiques sont capables de conférer à la plante hôte une résistance contre une large gamme de micro-organismes pathogènes.

## **2.7-La potentialisation**

La potentialisation (ou 'priming') est un état physiologique qui permet à la plante d'induire plus vite et/ou plus intensément ses mécanismes de défense lorsqu'elle est soumise à un stress biotique ou abiotique (Conrath *et al.*, 2002 & 2006 ; Conrath & Göllner, 2008 ; Conrath, 2009). Il en résulte une meilleure résistance de la plante vis-à-vis de ce stress. Cet état de pré-sensibilisation s'observe à la suite d'une attaque par un agent pathogène, une



**Fig. 24 :** Techniques permettant d'induire la potentialisation et la résistance contre les stress biotiques et abiotiques chez les plantes (Conrath, 2009).

blessure, la présence de micro-organismes bénéfiques ou d'un traitement par des molécules élicitrices (Fig. 24).

### **2.7.1-La potentialisation dans la SAR**

Dans le début des années 1990, Conrath *et al.* (1995) ont démontré qu'un traitement de cultures cellulaires de persil par l'AS, l'INA ou le BTH (Fig. 16) permet d'induire plus fortement les réponses de défense lorsque les cellules sont mises au contact d'un MAMP de *Phytophthora sojae*. Plus tard, Katz *et al.* (1998) et Thulke & Conrath (1998) ont démontré que la potentialisation est fonction de la concentration de la molécule sensibilisatrice et du gène étudié. De plus, les molécules élicitrices peuvent avoir un double rôle. En effet, une même concentration d'AS ou de BTH peut activer directement et spécifiquement certains gènes de défense et en même temps, en potentialiser d'autres lorsque les cellules sont en présence de l'agent pathogène. La potentialisation a été ensuite mise en évidence sur des plants entiers de tabac pré-traités avec de l'AS après blessure ou contact avec *P. syringae* pv. *syringae* (Mur *et al.*, 1996).

Une amélioration de la perception ou une amplification des réponses suite à la présence de l'agent pathogène ont été suggérées pour expliquer la potentialisation des mécanismes de défense. Pour cela, il a été envisagé un nombre plus important de récepteurs membranaires (pour la perception du stress) et une accumulation plus forte ou des modifications post-traductionnelles de molécules signal inactives qui seraient dans un état de 'dormance' jusqu'à la perception de l'agent pathogène, ceci pouvant expliquer par la suite des signaux et réponses de défense plus rapides et/ou plus intenses (Conrath *et al.*, 2006). Récemment, l'implication de deux membres de la famille des MAPKs, MPK3 et MPK6, a été démontrée dans l'amélioration de la signalisation suite à la perception d'un stress biotique ou abiotique, ceci étant associé à une induction plus importante des réponses de défense (Beckers *et al.*, 2009).

Chez le soja pré-traité avec de l'AS, l'induction de l'expression de gènes de défense, le 'burst oxydatif' et la mort cellulaire sont plus intenses en réponse à *P. syringae* pv. *glycinea* (Shirasu *et al.*, 1997). Chez l'asperge, l'AS potentialise l'activité de la PAL et le dépôt de lignine en réponse à *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* (He & Wolyn, 2005). Chez le tournesol, le concombre et *Vigna unguiculata*, le BTH potentialise la résistance contre



*Puccinia helianthi*, *Colletotrichum orbiculare* et *Colletotrichum destructivum* respectivement (Latunde-Dada & Lucas, 2001 ; Cools & Ishii, 2002 ; Prats *et al.*, 2002 ).

### **2.7.2-La potentialisation dans l'ISR**

La plupart des études réalisées sur la potentialisation dans un contexte d'ISR ont été menées avec des PGPRs (*cf* paragraphe 3.2.4). *P. fluorescens* souche WCS417r potentialise la synthèse de phytoalexines chez l'œillet lors d'attaques par *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* (Van Peer *et al.*, 1991). Chez le haricot, *Bacillus pumilus* SE34 induit un renforcement des parois par accumulation de callose et de composés phénoliques au niveau des sites de pénétration de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Benhamou *et al.*, 1996 ; Pieterse & van Loon, 2007). Verhagen *et al.* (2004) ont démontré que, chez l'arabette, la souche WCS417r induit la potentialisation de l'expression de divers gènes de défense (*VSP2*, *PDF1.2*, *HEL...*) via l'activation des voies AJ et/ou ET. D'après Pieterse *et al.* (2000) et Van der Ent *et al.* (2009), ce phénomène serait dû à une augmentation de la sensibilité de la plante aux hormones, et non pas à une augmentation de leur biosynthèse. D'autres études menées avec la souche WCS417r ont révélé que les facteurs de transcription MYB73 et MYC2 étaient requis pour la potentialisation dans les racines et les feuilles respectivement (Conrath, 2009).

Des micro-organismes bénéfiques autres que les PGPRs peuvent également induire la potentialisation. Par exemple, il a été rapporté chez la tomate que des champignons mycorhiziens potentialisent l'accumulation de protéines PR en réponse aux attaques de *Phytophthora parasitica* (Conrath & Göllner, 2008). De même, *Trichoderma asperellum* T203 potentialise l'expression de gènes codant des protéines PR lorsque le concombre est attaqué par le pathogène foliaire *P. syringae* pv. *lachrymans* (Shoresh *et al.*, 2005). Les MAMPs sont aussi d'excellents agents de pré-sensibilisation (Conrath, 2009).

### **2.7.3-L'application au champ**

Plusieurs techniques et molécules peuvent être utilisées pour induire un état de potentialisation (Fig. 24). Des molécules comme le Brotomax, le BABA et certains éliciteurs sont des agents potentialisateurs reconnus, leurs efficacités ayant été démontrées sous serre et au champ (Cohen, 2002). Par rapport à l'INA et l'AS, le BTH est bien toléré par les plantes et est utilisé sous les noms commerciaux de Bion<sup>®</sup>, Actigard<sup>®</sup> ou Boost<sup>®</sup>. Cependant, il a



davantage une action protectrice que curative, et de ce fait la communauté agricole préfère utiliser les fongicides curatifs classiques. *P. fluorescens* WCS374 et WCS417r, ainsi qu'un mélange de champignons mycorhiziens (MycoGrow™ Micronized Endo/Ecto Seed Mix) ont également prouvé leurs efficacités sous serre et au champ (Conrath, 2009).

L'utilisation de plantes transgéniques synthétisant constitutivement des molécules signal ou des protéines PR peuvent développer des phénotypes anormaux (Bowling *et al.*, 1994 & 1997). En revanche, l'induction d'un état de potentialisation chez la plante présente de nombreux avantages. En effet, les traitements de sensibilisation par des éliciteurs influent sur la physiologie de la plante : la croissance, les rendements et la production de semences sont améliorés. De plus, la mise en place des mécanismes de défense requiert moins d'énergie lorsque la plante est dans un état de potentialisation par comparaison avec des plantes non-sensibilisées au préalable. Étonnamment, les plantes sensibilisées sont dans un meilleur état physiologique que les plantes non-traitées à la suite d'un contact avec un agent pathogène, ce qui signifie que le coût énergétique de la potentialisation est contre-balancé par ses effets bénéfiques (Van Hulst *et al.*, 2006).

#### **2.7.4-Le phénomène de potentialisation chez la vigne**

Le BABA est un excellent inducteur de potentialisation : son action a été démontrée en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Cohen, 2002 ; Conrath, 2009). Il protège la vigne contre *P. viticola* (agent responsable du mildiou) par l'augmentation de l'accumulation de callose, de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de composés phénoliques, du métabolisme des stilbènes, ces effets étant liés à la signalisation par l'AJ. Malheureusement, son efficacité au champ n'a pas été obtenue sous une forte pression pathogénique par rapport aux fongicides couramment employés (Hamiduzaman *et al.*, 2005 ; Slaughter *et al.*, 2008 & 2009). Dubreuil-Maurizi *et al.* (2010) ont déterminé que la résistance observée contre cet agent pathogène en présence de BABA est associée à la potentialisation de la production d'une NADPH-oxydase. La laminarine sulfatée PS3 induit également la potentialisation de certaines réponses de défense (production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, induction de l'expression de gènes de défense, dépôts de callose et de composés phénoliques, et la RH) au niveau du site d'infection de ce champignon (Trouvelot *et al.*, 2008). Verhagen *et al.* (2010) ont démontré que *P. fluorescens* CHAO et *P. aeruginosa* 7NSK2 sont capables d'induire des réactions de défense dans des cultures cellulaires de vigne. Sur des feuilles issues de vitroplants, ces bactéries induisent une protection contre *B.*

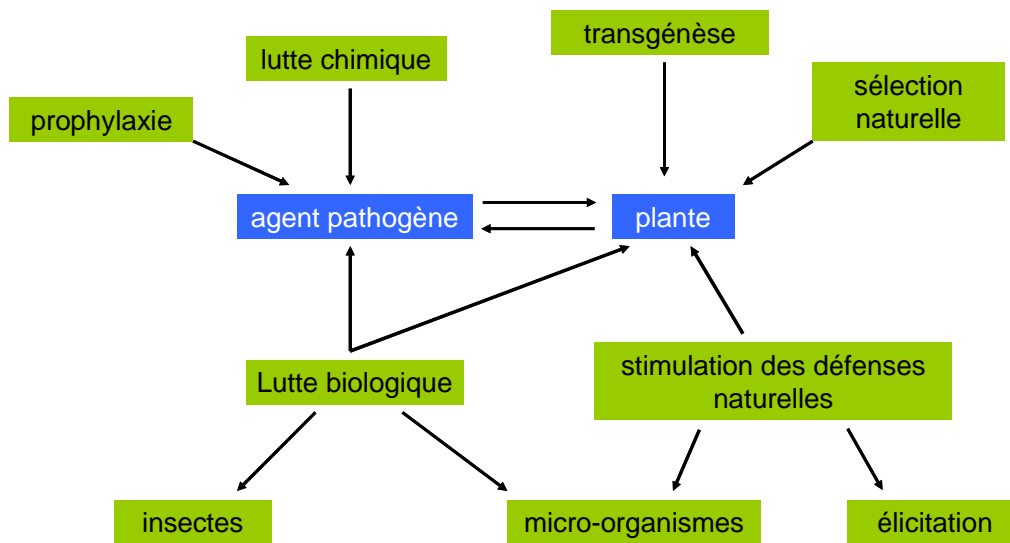


Fig. 25 : Les compléments à la résistance naturelle des plantes.

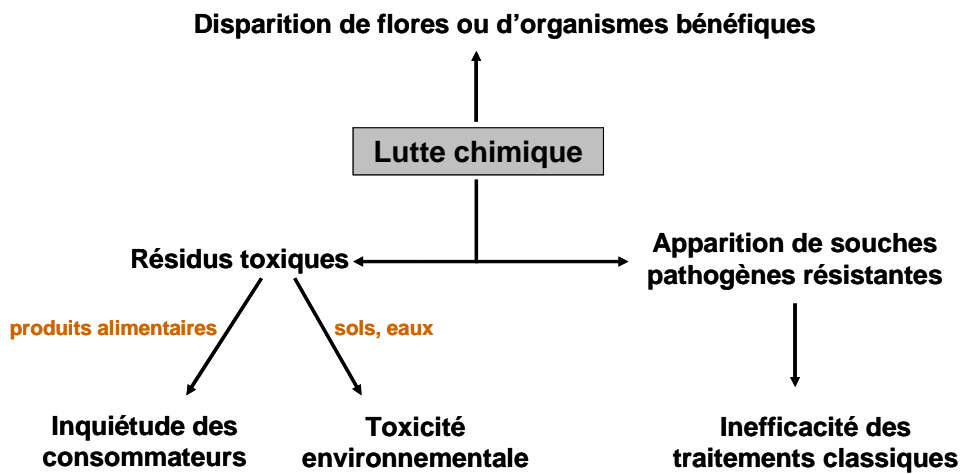


Fig. 26 : Les problématiques de la lutte chimique (d'après Gerhardson, 2002 ; Morissey *et al.*, 2004 ; Compant *et al.*, 2005a ; Avis *et al.*, 2008).



*cinerea* par la potentialisation de la biosynthèse de phytoalexines. À ce jour, aucune étude de potentialisation des réponses de la vigne suite à un stress abiotique n'a été menée.

### **3-Les compléments à la résistance naturelle**

Plusieurs méthodes de lutte contre les maladies existent de nos jours pour renforcer la résistance naturelle des plantes (Fig. 25). Le développement des maladies est principalement limité ou stoppé par l'utilisation massive et combinée de produits phytosanitaires. Dans le but de réduire leur utilisation, d'autres techniques sont de plus en plus employées comme la prophylaxie, la transgénèse ou la lutte biologique.

#### **3.1-La lutte chimique**

Depuis toujours, la lutte chimique s'est révélée être une méthode de lutte performante et indispensable pour combattre les agents pathogènes (Leroux, 2003 ; Pezet *et al.*, 2004). Bien que la viticulture ne représente que 3% de la SAU, elle consomme entre 30 et 50% des pesticides employés en France, la moitié étant des fongicides. Chez la vigne, la lutte chimique contre *B. cinerea* vient en complément des mesures prophylactiques. Depuis 2006, des stratégies à deux traitements sont recommandées en Champagne (Petit, 2008). Cependant, le nombre de traitements doit être ajusté selon la sensibilité de la parcelle et le risque acceptable pour le viticulteur.

Bien que leurs efficacités aient été largement démontrées, les pesticides présentent de nombreux inconvénients (Fig. 26). En effet, l'utilisation massive des pesticides a engendré l'apparition de souches pathogènes multi-résistantes, contre lesquelles les produits actuels sont devenus peu efficaces voire inefficaces. Certains produits présentent également une toxicité aiguë ou chronique pour l'utilisateur, le consommateur (traces de résidus), l'environnement (pollution des sols, rivières et nappes phréatiques) et les organismes non-cibles (Gerhardson, 2002 ; Heil & Walters, 2009 ; Cus *et al.*, 2010 ; Komarek *et al.*, 2010), ces derniers pouvant jouer un rôle important dans la stimulation des défenses naturelles des plantes (*cf* paragraphe 3.2.4). Une étude récente a d'ailleurs démontré que le sol des vignobles est contaminé par les fongicides (Komarek *et al.*, 2010). En Octobre 2007, le Grenelle de l'environnement a préconisé comme objectif de réduire de moitié l'usage des pesticides dans



le cadre du projet Ecophyto 2018 ([www.agriculture.gouv.fr](http://www.agriculture.gouv.fr)). De plus, il n'existe plus de traitements chimiques disponibles sur le marché pour lutter contre certaines maladies. L'exemple le plus probant est l'arrêt de l'emploi de l'arsenite de sodium en 2001 pour lutter contre l'esca (maladie du bois). À ce jour, il n'existe aucun traitement efficace pour contrer cette maladie et depuis 2002, son importance au vignoble ne cesse d'augmenter (Larignon *et al.*, 2009).

## **3.2-Les alternatives aux produits phytosanitaires**

### **3.2.1-La sélection variétale**

Après les ravages causés par le phylloxéra au début du XX<sup>ème</sup> siècle, des variétés d'hybrides ont été créées par croisement entre des espèces européennes (*V. vinifera*) et des espèces américaines résistantes ou des vignes du genre *Muscadinia*. Certains hybrides ont même été implantés dans les vignobles, bien que la qualité des vins produits soit médiocre (Doré & Varoquaux, 2006). En 1935, l'instauration des AOCs a contribué à l'arrachage d'une grande partie de ces hybrides en France, mais les études se sont poursuivies en Allemagne. La variété Regent, résultat du croisement entre la variété Diana (Sylvaner x Müller-Thurgau) et la variété Chambourcin (hybride américano-européen), présente une résistance à *P. viticola* ainsi qu'envers *E. necator*, et est cultivée en Allemagne depuis 1996 (Eibach *et al.*, 2007). La sélection variétale présente cependant deux inconvénients majeurs par rapport à la transgénèse : (i) le nombre de plantes issues du croisement est considérable et chaque plante doit être testée afin de s'assurer qu'elle possède les caractères souhaités, (ii) la stabilisation de la lignée est longue à obtenir, surtout si le cycle de développement de la plante est lent.

### **3.2.2-La transgénèse**

La transformation génétique est une solution alternative intéressante en terme de protection des plantes puisqu'elle consiste en l'introduction de gènes de résistance/tolérance inexistant dans la plante ou la sur-expression/répression de gènes déjà existants dans le patrimoine génétique initial sans modification des caractères agronomiques ni de la qualité des produits (Punja, 2001 ; Franks *et al.*, 2006 ; Gilbert *et al.*, 2006). Une autre stratégie consiste à transférer des gènes codant des protéines capables d'inhiber une fonction nécessaire

**Tableau 3 :** Exemples de MAMPs (microbial-associated molecular patterns) et DAMPs (dammage-associated molecular patterns). DAPG : 2,4-diacétylphoroglucinol ; NLP : protéines inductrices de nécroses ; PGPR : plant growth-promoting rhizobacteria (d’après Jourdan *et al.*, 2008 ; Postel & Kemmerling, 2009).

	éliciteur	origine
MAMPs	<b>isolés d'agents pathogènes</b>	
	transglutaminase	<i>Phytophthora</i> sp.
	EF-Tu	bactéries gram négatif
	xylanase	<i>Trichoderma</i> sp.
	harpine	bactéries gram négatif
	ergostérol	champignons
	chitine	champignons
	élicitines	<i>Phytophthora</i> sp., <i>Pythium</i> sp.
	invertase	levures
	NLP	bactéries et champignons
	<b>communs aux agents pathogènes et aux PGPR</b>	
	lipopolysaccharides (LPS)	bactéries gram négatif
	flagelline (peptide Flg22)	bactéries gram négatif
	<b>isolés de PGPR</b>	
	pyoverdines	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	acide salicylique, pyocheline	<i>P. fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
	DAPG	<i>P. fluorescens</i>
	pyocyanine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	surfactine, fengycine	<i>Bacillus subtilis</i>
	butandiol	<i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	N-acyl homosérine lactone	<i>Serratia liquefaciens</i>
DAMPs	oligouronides	pectines (paroi)
	cellodextrines	cellulose (paroi)
	monomères de cutine	cuticule

au déroulement du processus infectieux de l'agent pathogène (Cornelissen & Melchers, 1993). Le séquençage de la vigne (Jaillon *et al.*, 2007) va d'ailleurs accélérer les possibilités de transgénèse par l'identification de gènes impliqués dans la résistance contre divers agents pathogènes.

Il existe ainsi différentes possibilités de transgénèse permettant de lutter contre les agents pathogènes de la vigne. Par exemple, l'incorporation d'un gène codant une STS a permis d'accroître la production de resvératrol dans les plantes transgéniques (Fan *et al.*, 2008) et une meilleure résistance de vitroplants vis-à-vis de *B. cinerea* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001). La présence d'un gène codant une endochitinase réduit également l'infection par *B. cinerea* (Kikkert *et al.*, 1997 ; Reisch *et al.*, 2003). Bien que la directive européenne 2003/11/CE autorise la préparation de plants transgéniques de vigne, la profession vitivinicole reste opposée à l'utilisation de tels plants, craignant pour la réputation des vins français au niveau international. De plus, les consommateurs sont majoritairement contre l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (**OGMs**) comme le montre la destruction de parcelles expérimentales de l'INRA de Colmar en 2009 et 2010. De ce fait, d'autres moyens de lutte doivent être envisagés.

### **3.2.3-Les éliciteurs**

Les éliciteurs, tout comme l'utilisation de micro-organismes bénéfiques, s'inscrivent dans le contexte de la lutte biologique. Des exemples d'éliciteurs sont présentés dans le Tableau 3.

#### **3.2.3.1-Les MAMPs**

Anciennement appelés éliciteurs exogènes, ce sont en général des éléments nécessaires à la survie des micro-organismes, donc conservés au cours de l'évolution (Lyon, 2007 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2009). Leur nature est variée : glycoprotéines (Poinssot *et al.*, 2003 ; Garcia-Brugger *et al.*, 2006), oligosaccharides (Klarzynski *et al.*, 2000 ; Rabea *et al.*, 2003) ou composés lipidiques (Amborabé *et al.*, 2003 ; Zeidler *et al.*, 2004 ; Varnier *et al.*, 2009).

Les composants principaux de la paroi des champignons (chitine, glucanes, ergostérol, sphingolipides) sont d'excellents éliciteurs (Zhang *et al.*, 2002 ; Umemura *et al.*, 2004 ; Lyon,



2007 ; Zhang *et al.*, 2010). Ces dernières années, de nombreuses études ont également porté sur les lipopolysaccharides (**LPS**) issus de la paroi de bactéries pathogènes (Davies *et al.*, 2006) ou bénéfiques (Gerber & Dubery, 2004 ; Gerber *et al.*, 2004 ; Ongena *et al.*, 2007 ; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007 ; van Loon *et al.*, 2008), ainsi qu'à partir du flagelle (notamment le peptide flg22 de la flagelline ; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2009).

Les sidérophores et antibiotiques (*cf* paragraphe 3.2.4.3.b) produits par de nombreux *Pseudomonas* sp. fluorescents sont capables d'induire des réactions de défense : pyoverdine, pyocyanine (*P. aeruginosa* 7NSK2), 2, 4-diacetylphloroglucinol (**DAPG** ; *P. fluorescens* CHAO et Q2-87), pseudobactines (Shoda, 2000 ; Audenaert *et al.*, 2002 ; Haas & Defago, 2005 ; Adam, 2008 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2009). Les champignons synthétisent également des molécules élicitrices : les peptaibols et xylanases produits par *Trichoderma* sp. (Harman *et al.*, 2004 ; Harman, 2006 ; Hoitink *et al.*, 2006 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2009), et les élicitines de *Phytophthora* sp. et *Pythium* sp. (Lyon *et al.*, 2007). D'autres micro-organismes vont produire de l'AS (van Loon *et al.*, 1998) ou des composés organiques volatiles (**VOCs**) : NO, 2,3-butanediol (Ryu *et al.*, 2004 ; Lyon, 2007 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2009).

### 3.2.3.2-Les DAMPs et produits végétaux

De nombreux DAMPs (Hématy *et al.*, 2009 ; *cf* paragraphe 2.2), anciennement appelés éliciteurs endogènes, et d'extraits de plantes ont été caractérisés comme agent éliciteur ces dernières années : brassinolide, oligogalacturonides, oxalate, extraits d'*Hedera helix*, VOCs produits en réponse à une blessure et extraits d'algues marines (Bouarab *et al.*, 1999 ; Klarzynski *et al.*, 2000 ; Nakashita *et al.*, 2003 ; Lyon, 2007).

Les molécules de signalisation (AJ, ET, AS et leurs intermédiaires et dérivés) sont aussi capables d'éliciter les mécanismes de défense (Belhadj *et al.*, 2006 ; Faurie *et al.*, 2009 ; Radhakrishnan & Balasubramanian, 2009). Par exemple, l'AS augmente les activités de plusieurs enzymes dont les inhibiteurs de protéase, de trypsine et de chymotrypsine tout en potentialisant leurs activités chez *Curcuma longa* (L.) au contact de *Pythium aphanidermatum* (Radhakrishnan & Balasubramanian, 2009). Le MeJA réduit la taille des nécroses causées par *B. cinerea* chez la tomate. Cette protection durable induit la synthèse de la LOX et la





formation de FAOs permettant d'activer la voie de synthèse de l'ET (Yu *et al.*, 2009). Chez le riz, la riboflavine (vitamine) et l'AJ potentialisent l'expression de la LOX qui va activer la voie des phénylpropanoïdes aboutissant à une augmentation du processus de lignification, assurant ainsi une protection contre *Rhizoctonia solani* (Taheri & Tarighi, 2009). D'autres composés plus ou moins connus peuvent également agir comme éliciteurs : la saccharine et la laminarine (Ménard *et al.*, 2004 ; Lyon, 2007), le BABA (Ton & Mauch-Mani, 2004). Des acides gras, tels que les acides arachidonique, linoléique, oléique et éicosapentaénoïque induisent une résistance systémique contre *Phytophthora infestans* chez la pomme de terre (Cohen *et al.*, 1991).

Les UV et des composés d'origine abiotique peuvent aussi stimuler les mécanismes de défenses des plantes dont la vigne : le cuivre (également utilisé comme fongicide), le chlorure d'aluminium, le calcium, les sels de phosphate et de potassium (Langcake & Pryce, 1977 ; Adrian *et al.*, 1996 ; Coulomb *et al.*, 1998 ; Reuveni & Reuveni, 1998 ; Bonomelli *et al.*, 2004 ; Borie *et al.*, 2004).

### 3.2.3.3-Les éliciteurs commercialisés

Certains fongicides peuvent avoir une action antagoniste directe sur les agents pathogènes, et en même temps induire une résistance. L'Oryzemat<sup>®</sup> dont le composant actif est le probenazole, le DDCC (2, 2-dichloro-3, 3-diméthylcyclopropane), le pyraclostrobin (métabolite actif du probenazole), le Talius<sup>®</sup> (molécule : proquinazide) sont des fongicides éliciteurs utilisés en champs (Lyon, 2007 ; Gus *et al.*, 2010). Parmi les éliciteurs commercialisés, certains sont synthétiques. Le plus connu est le BTH, commercialisé sous le nom Bion<sup>®</sup>. Il protège le blé contre le mildiou où son efficacité peut persister jusqu'à 10 semaines (Ruess *et al.*, 1996), la tomate (Nombela *et al.*, 2005) ainsi que le tournesol (Buschmann *et al.*, 2005). L'INA et le NCI (N-cyanométhyl-2-chloroisonicotinamide) peuvent être appliqués sur différentes cultures comme le citron et le riz (Lyon *et al.*, 2007). Les éliciteurs commercialisés peuvent également être d'origine naturelle. On peut par exemple citer l'harpine (Messenger<sup>®</sup> ou Stifenia<sup>®</sup>), le chitosan (Elexa<sup>™</sup>), connu aussi pour ses propriétés antifongiques, et les oligosaccharides issus d'algues comme la laminarine sulfatée (Iodus 40<sup>®</sup> ; Leadbeater & Staub, 2007 ; Yin *et al.*, 2010). Les vitamines B1 et B2, la riboflavine, l'acide cholique (acide biliaire des animaux) et les UV-C peuvent aussi être utilisés au champ afin de protéger les cultures (Sharathchandra *et al.*, 2004 ; Lyon, 2007).



### 3.2.3.4-Les éliciteurs de la vigne

Plusieurs éliciteurs sont actuellement testés ou utilisés sur la vigne afin de la protéger contre divers agents pathogènes, notamment *B. cinerea* (Elmer & Reglinski, 2006).

L'ergostérol (stérol majeur des champignons) élicite les mécanismes de défense de cultures cellulaires : *STS*, synthèse de LTPs, accumulation de resvératrol (Laquitaine *et al.*, 2006). Bru *et al.* (2006) ont aussi obtenu une activation de plusieurs réponses de stress sur des cultures cellulaires avec une cyclodextrine modifiée. La cyclodextrine provoque un influx de  $Ca^{2+}$ , un burst oxydatif ( $H_2O_2$ ) et induit l'expression d'enzymes de la voie des phénylpropanoïdes et de protéines PR (Aziz *et al.*, 2007). Le chitosan, composé issu de l'exosquelette de crustacés ou d'insectes, stimule la LOX et la PAL, induit la production de phytoalexines et de protéines PR (type glucanase et chitinase), assurant aux feuilles de vigne une protection contre *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2004 ; Aziz *et al.*, 2006 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2006). La laminarine induit les événements précoces de défense (influx de  $Ca^{2+}$ , alcalinisation du milieu, 'burst oxydatif'), l'expression de gènes de défense (comme *Chit4C*) ainsi que la production de phytoalexines, ce qui permet une protection contre *B. cinerea* et *P. viticola* (Aziz *et al.*, 2003 & 2004). De plus, la laminarine sulfatée PS3 potentialise certaines réponses de défense (production d' $H_2O_2$ , induction de l'expression de gènes de défense, dépôts de callose et de composés phénoliques, et la RH) au niveau du site d'infection de *P. viticola* (Trouvelot *et al.*, 2008). Des rhamnolipides, issus de *Pseudomonas aeruginosa*, induisent un influx de  $Ca^{2+}$ , l'activation de MAPK et la production de FAOs. Ces événements précoces engendrent par la suite la RH et l'induction de l'expression de gènes de défense tels que *Chit4C*, *PIN* et *Gluc* (Varnier *et al.*, 2009). De plus, ces rhamnolipides peuvent avoir une activité antagoniste directe envers *B. cinerea* et ils protègent la vigne contre ce champignon (Varnier *et al.*, 2009). Les oligogalacturonides peuvent également induire l'expression de *Chit4C* (Aziz *et al.*, 2004 & 2007). L'endopolygalacturonase BcPG1, isolée à partir de *B. cinerea* souche T4, induit un influx de  $Ca^{2+}$ , la production de FAOs, l'activation de MAPKs, l'expression de gènes de défense et la production de phytoalexines (Poinssot *et al.*, 2003). Plus tard, Vandelle *et al.* (2006) ont démontré que la production de NO, induite par BcPG1, est impliquée dans l'induction de l'expression de certains gènes de défense tels que *PAL* et *STS*.

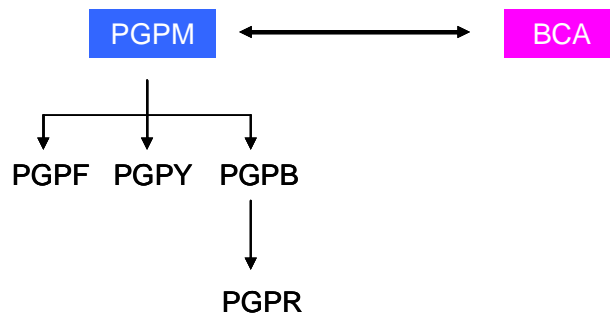


Fig. 27 : Classification des micro-organismes bénéfiques. BCA : biocontrol agent ; PGPB : plant growth-promoting bacterium ; PGPF : plant growth-promoting fungus ; PGPM : plant growth-promoting microorganism ; PGPR : plant growth-promoting rhizobacterium ; PGPY : plant growth-promoting yeast (d'après Lugtenberg *et al.*, 2001 ; Compant *et al.*, 2005a ; Bent, 2006 ; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006 ; Avis *et al.*, 2008).

Tableau 4 : Exemples d'interaction entre des PGPMs ('plant growth-promoting microorganism') et leurs plantes hôtes. PGPR : plant growth-promoting rhizobacterium ; PGPF : plant growth-promoting fungus.

	Micro-organismes	Hôte	Références
P G P R	<i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Pseudomonas aurantica</i> SR1 <i>Pseudomonas</i> sp <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LES4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Rhizobium</i> spp. <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	ray-grass blé, maïs caféier, pin, vigne, pomme de terre, carotte... sésame piment œillet, blé, tomate, radis, œillet pomme de terre, haricot, pois concombre, tabac, arabette tomate, concombre caféier, betterave, tabac, trèfle	Shoebitz <i>et al.</i> (2009) Rosas <i>et al.</i> (2009) Siddiqui (2005) ; Mercado-Blanco & Bakker (2007) Kumar <i>et al.</i> (2009) Siddiqui & Meon (2009) Siddiqui (2005) ; Choudhary & Johri (2009) Avis <i>et al.</i> (2008) Adam, 2008 Ongena <i>et al.</i> (2005a, 2005b, 2007) Adam (2008)
	P G P F	<i>Penicillium oxalicum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Glomus</i> spp. <i>Trichoderma</i> spp.	melon, pastèque bananier haricot, tomate

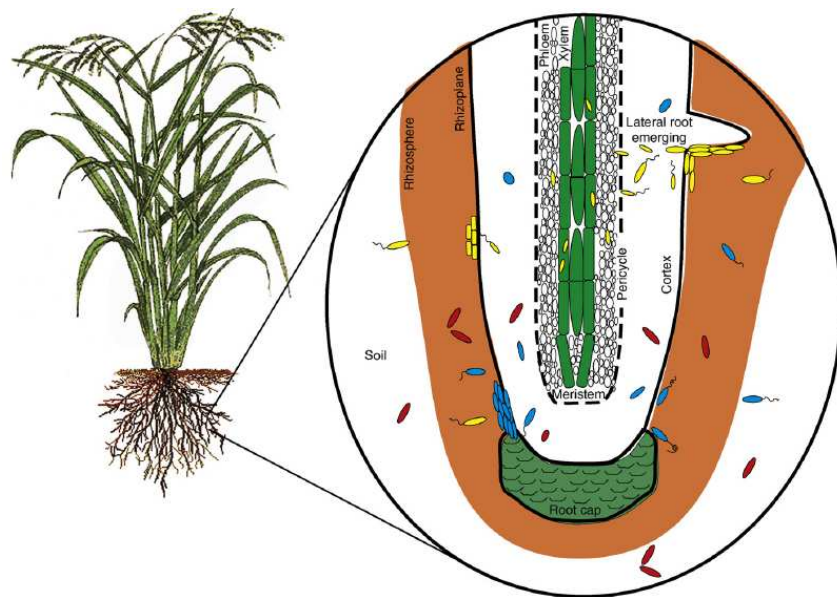
Concernant les molécules signal, Busam *et al.* (1997) ont démontré qu'une application d'AS stimule l'accumulation de protéines PR sur des cultures cellulaires, celle-ci étant également observée sur les racines, feuilles, tiges et baies (Renault *et al.*, 1996 ; Derckel *et al.*, 1996 & 1998). Le MeJA induit l'expression de *PR-1*, *PR-2*, *PR-8*, *PAL*, *PIN* (inhibiteur de protéase, *PR-6*) et *Chit4C* (Repka, 2001 ; Repka *et al.*, 2004 ; Belhadj *et al.*, 2008b ; Faurie *et al.*, 2009), la production de phytoalexines (Faurie *et al.*, 2009) et d'AS (Belhadj *et al.*, 2008b) sur cultures cellulaires, ainsi qu'une accumulation de callose chez les plantes (Belhadj *et al.*, 2006).

### **3.2.4-Les micro-organismes bénéfiques**

Une autre alternative à l'utilisation des pesticides consiste en l'utilisation de micro-organismes bénéfiques. Ce sont essentiellement des champignons, bactéries et levures. Bakker *et al.* (2003) les classent selon qu'ils interagissent directement ou indirectement avec la plante. Récemment, Avis *et al.* (2008) ont proposé les termes **PGPM** ('Plant Growth Promoting Microorganism') pour les micro-organismes qui agissent sur la plante, et **BCA** ('BioControl Agent') pour ceux qui agissent sur les agents pathogènes (Fig. 27). Cependant, il est très fréquent qu'un micro-organisme bénéfique puisse être à la fois un PGPM et un BCA. En raison de leurs effets bénéfiques sur leurs plantes hôtes, ils suscitent un très grand intérêt en agriculture (Morrisey *et al.*, 2004 ; Morgan *et al.*, 2005).

#### **3.2.4.1-Classification des PGPMs**

L'action principale des **PGPMs** est souvent la stimulation de la croissance de leur plante hôte. En raison de leur nature, leur origine et leurs actions, plusieurs termes ont été avancés ces dernières années afin de les classifier plus précisément. Ainsi, les termes **PGPF** ('Plant Growth Promoting Fungus'), **PGPY** ('Plant Growth Promoting Yeast') et **PGPB** ('Plant Growth Promoting Bacterium') permettent de différencier les PGPMs en fonction de leur nature (Fig. 27 ; Bent, 2006 ; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006 ; Compant *et al.*, 2005a). De nombreux PGPMs ont été isolés récemment (Tableau 4). Les principaux PGPFs sont affiliés aux *Trichoderma* sp., *Pythium* sp. et *Fusarium* sp., les PGPBs aux *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. et les PGPYs aux *Candida* sp., *Trichosporon* sp., *Cryptococcus* sp. et *Pichia* sp. Leur action est généralement hôte-dépendante mais certains PGPMs ont la possibilité d'engendrer des effets bénéfiques sur diverses plantes. Enfin, une autre classification basée



**Fig. 28** : Types de micro-organismes endophytes et les voies de pénétration racinaire possibles. En rouge : les micro-organismes endophytes occasionnels ; en bleu : les micro-organismes endophytes opportunistes ; en jaune : les micro-organismes possédant la machinerie enzymatique nécessaire pour la pénétration (Hardoim *et al.*, 2008).

sur la localisation existe pour les PGPBs. La plupart des PGPBs sont présentes dans la rhizosphère, zone de quelques millimètres entourant le système racinaire des plantes (Lugtenberg *et al.*, 2001 ; Compant *et al.*, 2010). Il s'agit d'une zone très riche en micro-organismes où de nombreux échanges s'effectuent (Morgan *et al.*, 2005). Le terme **PGPR** ('Plant Growth-Promoting Rhizobacterium') désigne ces PGPBs.

### 3.2.4.2-Les micro-organismes endophytes

#### a-Définition

Certaines bactéries et champignons ont la capacité de pénétrer à l'intérieur de la plante sans engendrer de symptômes. Un micro-organisme est considéré comme endophyte lorsqu'il est isolé d'un organe de la plante dont la surface aura été stérilisée préalablement (Hallmann *et al.*, 1997 ; Iniguez *et al.*, 2005 ; He *et al.*, 2009). Les PGPRs endophytes ont été classées en deux groupes : les PGPRs extracellulaires (**ePGPR**) qui colonisent la rhizosphère, le rhizoplan et les espaces entre les cellules du cortex racinaire, et les PGPRs intracellulaires (**iPGPR**) qui existent à l'intérieur des cellules racinaires, généralement dans les nodules (Gray & Smith, 2005). Les micro-organismes endophytes établissent ainsi une relation plus étroite avec leur hôte et sont davantage protégés contre les stress biotiques et abiotiques et peuvent de ce fait interagir plus longtemps avec la plante (Hallmann *et al.*, 1997). Les effets de cette interaction peuvent se manifester par une promotion de croissance, une protection *via* l'induction de l'ISR et/ou une action antagoniste directe sur les agents pathogènes (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006 ; Mejia *et al.*, 2008 ; Ryan *et al.*, 2008 ; Bailey *et al.*, 2009 ; Harish *et al.*, 2009 ; He *et al.*, 2009).

#### b-Pénétration au sein de la plante

La plupart des PGPRs peuvent coloniser leur hôte de façon endophytique (Sturz *et al.*, 2000 ; Lodewyckx *et al.*, 2002 ; Novak & Shulaev, 2003). Au niveau racinaire, la colonisation endophytique peut se réaliser de différentes façons. Tout d'abord la zone d'émergence des racines secondaires constitue une ouverture naturelle permettant l'entrée des PGPRs à l'intérieur de la plante (Fig. 28 ; Hardoim *et al.*, 2008 ; Compant *et al.*, 2010). Ensuite, des blessures peuvent également permettre l'entrée des PGPRs (Lodewyckx *et al.*, 2002 ; Hardoim *et al.*, 2008). Enfin, une autre possibilité consiste en la sécrétion par le micro-

Tableau 5 : Exemples de micro-organismes endophytes.

	Souche	Plante hôte	Références
Bactéries	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf1, <i>Bacillus</i> spp. EPB22	bananier	Harish <i>et al.</i> (2009)
	complexe <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Pantoea</i> sp., <i>Kluyvera</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp.	canne à sucre	Mendes <i>et al.</i> (2007) ; Magnani <i>et al.</i> (2010)
	<i>Pantoea agglomerans</i>	eucalyptus	Ferreira <i>et al.</i> (2008)
	<i>Phyllobacterium</i> sp. (EBBLQ01)	<i>Epimedium brevicomu</i>	He <i>et al.</i> (2009)
	<i>Pantoea</i> sp., <i>Microbacterium</i> sp., <i>Frigoribacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp.	maïs	Bayman (2007) ; Rijavec <i>et al.</i> (2007)
	<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	citronnier	Araujo <i>et al.</i> (2001)
	souche non-identifiée	tabac	Mastretta <i>et al.</i> (2009)
	<i>Enterobacter asburiae</i> JM22	coton	Quadt-Hallmann <i>et al.</i> (1997)
Champignons	<i>Pantoea</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Rhizobium</i> sp.	riz	Verma <i>et al.</i> (2004) ; Gyaneshwar <i>et al.</i> (2001)
	<i>Trichoderma</i> sp.	cacaotier	Mejia <i>et al.</i> (2008) ; Bailey <i>et al.</i> (2009)
	<i>Cladosporium</i> sp., <i>Nemania</i> sp., <i>Rhytismataceae</i> sp.	pin	Ganley <i>et al.</i> (2008)
	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> , <i>Guignardia citricarpa</i> , <i>Cladosporium</i> sp.	citronnier	Araujo <i>et al.</i> (2001)
	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	caféier	Vega <i>et al.</i> (2009)
	<i>Piriformospora indica</i>	orge	Waller <i>et al.</i> (2005)
	<i>Trichoderma asperellum</i> T34	arabette	Segarra <i>et al.</i> (2009)
	<i>Glomus intraradices</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Liu <i>et al.</i> (2007)

Tableau 6 : Micro-organismes endophytes naturels de la vigne.

Origine	Espèce endophytique	Références
racines	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Trotel-Aziz <i>et al.</i> (2003)
tige	<i>Bacillus fastidiosus</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Comamonas terrigena</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Klebsiella terrigena</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Moraxella bovis</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas cichorii</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Trotel-Aziz <i>et al.</i> (2003)
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas putida</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bell <i>et al.</i> (1995)
	<i>Rahnella aquatilis</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)
<i>Rhodococcus luteus</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)	
<i>Staphylococcus</i> spp.	Bell <i>et al.</i> (1995)	
<i>Xanthomonas campestris</i>	Bell <i>et al.</i> (1995)	
vitroplants	<i>Bacillus pumilus</i>	Thomas (2004)
	<i>Brevibacillus</i> spp.	Thomas (2006)
feuilles	<i>Pantoea agglomerans</i>	Trotel-Aziz <i>et al.</i> (2003)
	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	Lo Piccolo <i>et al.</i> (2010)
pied	<i>Bacillus</i> spp.	Wes <i>et al.</i> (2010)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	
	<i>Curtobacterium</i> spp.	
	<i>Streptomyces</i> spp.	



organisme d'enzymes dégradant les parois cellulaires de la plante telles que des cellulases, endoglucanases, polygalacturonases ou xylanases (Gyaneshwar *et al.*, 2001 ; Lodewyckx *et al.*, 2002). Cette sécrétion enzymatique est de faible intensité et occasionnelle dans la mesure où elle n'aboutit pas à la destruction des tissus (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006).

La pénétration au niveau de la tige peut se faire *via* les blessures et la sécrétion d'enzymes. Au niveau foliaire, la pénétration a lieu généralement par les stomates (Hardoim *et al.*, 2008).

### c-Exemples de micro-organismes endophytes

De nombreux micro-organismes endophytes ont été isolés à partir de diverses plantes (Tableau 5). En effet, grâce à leur étroite relation avec leur hôte et leurs effets bénéfiques sur ce dernier, ils présentent un intérêt particulier en lutte biologique (Backman & Sikora, 2008). Les champignons endophytes ont été très étudiés ces dernières années du fait de leur capacité à synthétiser de nombreux métabolites secondaires (Schulz *et al.*, 2002 ; Suryanarayanan *et al.*, 2009).

### d-Les micro-organismes endophytes naturels de la vigne

Plusieurs études ont porté sur la caractérisation des populations endophytiques naturelles de la vigne (Tableau 6). Certaines de ces bactéries (*Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. et *Pantoea* sp.), issues du vignoble champenois, protègent la vigne contre *B. cinerea* (Trotel-Aziz *et al.*, 2003 ; Magnin-Robert *et al.*, 2007). Des études menées par Ait Barka *et al.* (2000 & 2002) et Compant *et al.* (2005b & 2008a) ont démontré que *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN (*cf* paragraphe 4.3.2) peut pénétrer dans les racines et diffuser jusqu'aux feuilles et inflorescences *via* les vaisseaux du xylème, et protéger la plante contre *B. cinerea*. Récemment, *B. phytofirmans* a été retrouvée dans les vignobles italiens (Lo Piccolo *et al.*, 2010).

### 3.2.4.3-Modes d'action des micro-organismes bénéfiques

Bien que les micro-organismes soient classés en PGPMs ou BCAs, il est très fréquent qu'ils possèdent certaines propriétés de ces deux groupes simultanément (Siddiqui, 2005 ;

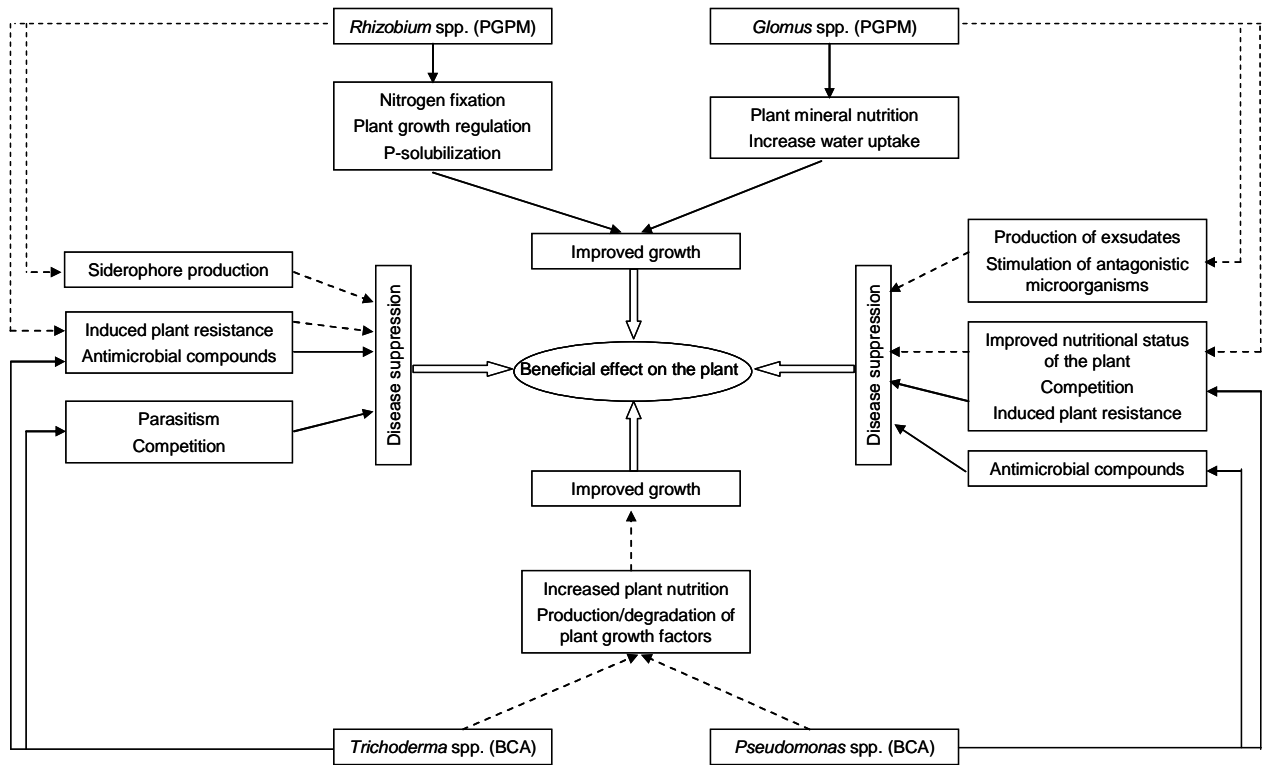


Fig. 29 : Modes d'action de quelques PGPMs (plant growth-promoting microorganism) et BCAs (biocontrol agent). Les traits pleins représentent les effets bénéfiques primaires du micro-organisme sur la plante et les traits en pointillés les effets bénéfiques secondaires (Avis *et al.*, 2008).

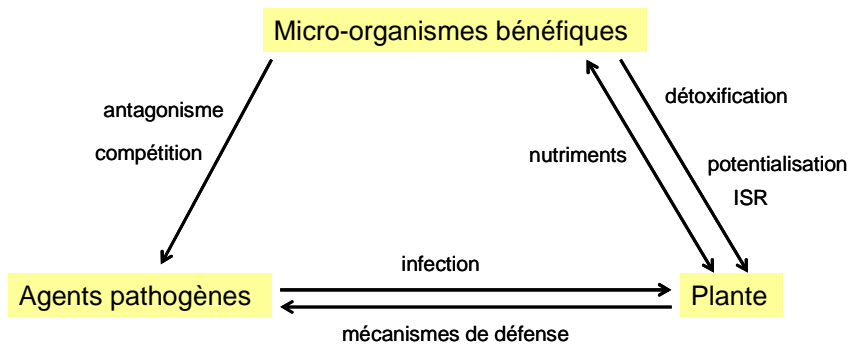


Fig. 30 : Schéma représentant la relation tripartie existant entre la plante, l'agent pathogène et le micro-organisme bénéfique. ISR : résistance systémique induite.

Avis *et al.*, 2008 ; Shoebitz *et al.*, 2009). Les propriétés de certains PGPMs et BCAs ont récemment été décrites (Fig. 29 ; Avis *et al.*, 2008).

#### a-Modes d'action des PGPMs

Un PGPM peut posséder différentes propriétés. Contrairement aux BCAs, il agit directement sur la plante. Ainsi, il stimule la croissance de son hôte et peut lui conférer une protection envers certains agents pathogènes *via* l'induction d'un état de potentialisation et/ou de l'ISR (Fig. 30 ; Kloepper *et al.*, 1999).

Il est clairement établi que les PGPMs stimulent la croissance des plantes ce qui a pour conséquence un meilleur rendement. En fait, ces phénomènes sont observés car les PGPMs, principalement les PGPRs, agissent sur la plante hôte par divers mécanismes telles qu'une détoxification du sol (métaux lourds), un apport en nutriments (azote, fer, zinc, phosphate), une production de composés volatiles, de phytohormones (AIA, CK et GA) ou une synthèse d'enzymes (Fig. 31 ; Bloemberg & Lugtenberg, 2001 ; Ping & Boland, 2004 ; Compant *et al.*, 2005a ; Siddiqui, 2005 ; van Loon, 2007 ; Spaepen *et al.*, (2009) ; Rosas *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2009). Par exemple, les *Rhizobia* (*Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp. et *Sinorhizobium* sp.) sont connus pour former des relations symbiotiques avec les légumineuses et améliorer la fixation de l'azote par la formation de nodosités (Avis *et al.*, 2008). De plus, certaines PGPRs protègent également les plantes contre les stress abiotiques (Timmusk & Wagner, 1999 ; Yang *et al.*, 2009).

De nombreuses PGPBs ont la capacité de synthétiser de l'AIA à partir du tryptophane (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003 ; Kang *et al.*, 2006 ; Avis *et al.*, 2008). Cette hormone favorise entre autre la rhizogénèse, donc l'élaboration d'un système racinaire plus développé assurant un meilleur apport en nutriments et en eau. De plus, certaines PGPBs secrètent l'ACC déaminase qui permet de cliver l'ACC, précurseur de l'éthylène qui inhibe la croissance racinaire et induit la sénescence (Glick *et al.*, 1998 ; Vessey , 2003 ; Sturz & Christie, 2003 ; Ping & Boland, 2004 ; Sessitsch *et al.* 2005).

Les PGPMs peuvent aussi agir indirectement sur les micro-organismes pathogènes en stimulant le développement des barrières naturelles des plantes (Siddiqui, 2005 ; Compant *et*

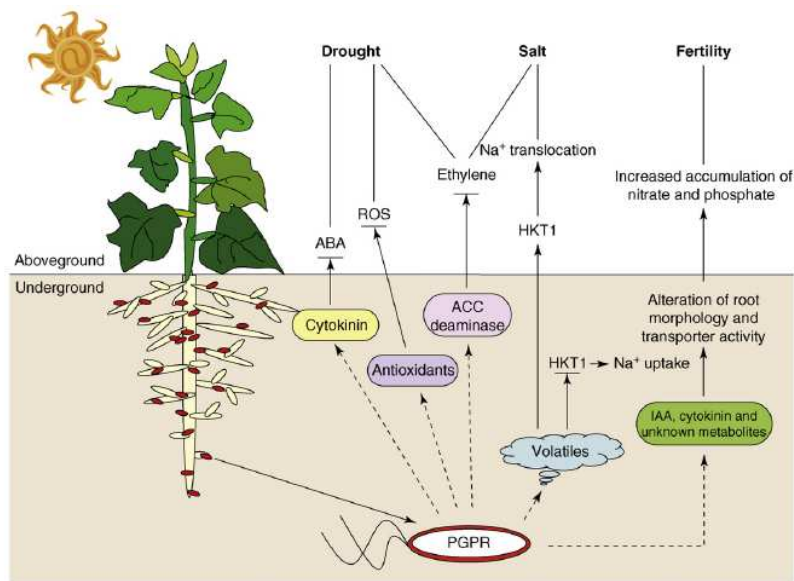


Fig. 31 : Modes d'action possibles des PGPRs (plant growth-promoting rhizobacterium). ABA : acide abscissique ; ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique ; HKT1 : High-Affinity K<sup>+</sup> Transporter 1 ; IAA : indole-acetic acid ; ROS : reactive oxygen species (Yang *et al.*, 2009).

*al.*, 2007 ; Pieterse & van Loon, 2007). Ainsi, l'agent pathogène rencontrera plus de difficultés à coloniser la plante lors du processus infectieux.

#### b-Modes d'action des BCAs

Les BCAs agissent directement sur les agents pathogènes. Ils peuvent inhiber leur développement ou les détruire de différentes manières : synthèse d'antibiotiques et/ou d'enzymes, parasitisme, compétition pour les niches écologiques ou les nutriments (Shoda, 2000 ; Bakker *et al.*, 2003 ; Compant *et al.*, 2005a). Ainsi, ils agissent indirectement sur la plante par la suppression de son agent pathogène, ce qui augmente son rendement.

Les BCAs peuvent parasiter les agents pathogènes notamment par la synthèse d'enzymes lytiques (chitinases, glucanases, cellulases) qui vont dégrader les parois de l'agent pathogène (Whipps, 2001 ; Compant *et al.*, 2005a ; Siddiqui, 2005 ; Harman, 2006).

La compétition pour les nutriments se fait généralement par la disponibilité en fer dans le milieu. De nombreuses bactéries et champignons sont capables de produire des agents chélateurs appelés sidérophores qui vont piéger le fer présent dans le milieu, privant ainsi les autres micro-organismes de cet élément qui peut être indispensable à leur développement ou leur pouvoir pathogène (Lemanceau *et al.*, 2009). Ils peuvent même éliciter les mécanismes de défense (*cf* paragraphe 3.2.3.1).

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut-être le plus répandu chez les BCAs. De nombreux BCAs synthétisent des métabolites à activités antifongiques et/ou antibactériennes qui inhibent la croissance des agents pathogènes. *Bacillus subtilis* produit plusieurs antibiotiques : zwittermycine-A, kanosamine, lipopeptides des familles de la surfactine, iturine, fengycine (Peypoux *et al.*, 1999 ; Bonmatin *et al.*, 2003 ; Lin *et al.*, 2005 ; Rahman *et al.*, 2007). Récemment, Zhao *et al.* (2009) ont découvert deux nouveaux antibiotiques produits par *Bacillus vallismortis*. Chez les *Pseudomonas* sp., l'acide cyanhydrique (HCN), le viscosamide, la pyoluteorine, le DAPG, la pyrrolnitrine, les phénazines et les butyrolactones ont été identifiés comme antibiotiques (Raaijmakers *et al.*, 1995 ; Whipps, 2001 ; Haas & Keel, 2003 ; Haas & Defago, 2005). *Streptomyces* sp. et *Stenotrophomonas* sp. sont également capables de produire des antibiotiques (Kim *et al.*, 1999 ; Nakayama *et al.*, 1999).



#### 3.2.4.4-Micro-organismes utiles pour lutter contre *B. cinerea* chez la vigne

Chez la vigne, certains champignons ou bactéries permettent d'améliorer la résistance à *B. cinerea* (Elmer & Reglinski, 2006). Les premières études ont porté sur les *Trichoderma* sp. (Dubos *et al.*, 1978 & 1982). Des formulations à base de *T. harzianum* et *T. viride* ont même été commercialisées en tant qu'anti-*Botrytis*, avec une efficacité parfois équivalente aux programmes de référence (Harman *et al.*, 1996 ; Latorre *et al.*, 1997 ; Sesan *et al.*, 1999). Actuellement, le produit Serenade® (formulation à base de *Bacillus subtilis* QST713) est homologué provisoirement pour la protection des grappes contre la pourriture grise ([www.serenade-biofungicide.com](http://www.serenade-biofungicide.com)). Les effets d'autres micro-organismes sur la vigne (*Candida* sp., *Cladosporium* sp., *Ulocladium* sp. et *Bacillus* sp.) ont également été étudiés (Munkvold & Marois, 1993 ; Paul *et al.*, 1997 & 1998 ; Zahavi *et al.*, 2000 ; Elmer & Reglinski, 2006).

Ces dernières années, plusieurs bactéries (*Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. et *Pantoea* sp.), isolées à partir du vignoble champenois, ont été capables d'activer des réponses de défense dans des feuilles et des grappes au vignoble et d'inhiber la croissance de *B. cinerea* (Magnin-Robert *et al.*, 2007). Récemment, Loqman *et al.* (2009) ont isolé différentes souches d'actinomycètes de la rhizosphère de ceps sains de vignobles marocains. Parmi celles-ci, 3 *Streptomyces* sp. et 3 *Micromonospora* sp. ont montré des propriétés antagonistes envers *B. cinerea* et induisent même une protection contre ce champignon *in vitro*. De même, Verhagen *et al.* (2010) ont démontré que *P. fluorescens* CHAO et *P. aeruginosa* 7NSK2 induisent une protection contre ce champignon, notamment par la potentialisation de la biosynthèse de phytoalexines.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons depuis plus de 10 ans sur l'interaction entre la vigne et *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN (*cf* paragraphe 4.3). Cette PGPR possède une activité antagoniste envers *B. cinerea in vitro* et protège la plante contre ce champignon. À ce jour, les mécanismes impliqués dans la protection de la plante n'ont pas été déterminés.





## **4-Les *Burkholderia* sp.**

### **4.1-Description du genre**

Le genre *Burkholderia* (en hommage au phytopathologiste Walter H. Burkholder) a été créé en 1992 par Yabuuchi *et al.* (1992). Auparavant affiliées aux *Pseudomonas* sp. de groupe II, de nombreuses bactéries ont été reclassées grâce aux avancées technologiques en biologie moléculaire en *Burkholderia* sp. de par la nature de leur ARN ribosomal. Actuellement, *Burkholderia* sp. regroupe plus de 40 espèces ([www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)) isolées à partir de diverses niches écologiques (Coenye & Vandamme, 2003 ; Vandamme *et al.*, 2007 ; Compant *et al.* 2008b).

Ce genre se caractérise par des bactéries gram négatif, aérobies, non sporulantes, possédant un ou plusieurs flagelles de type polaire à l'exception de *B. mallei*. Elles possèdent toutes une activité catalase ainsi qu'une activité oxydase (excepté de *B. gladioli*) plus ou moins forte. Elles sont capables d'utiliser diverses sources de carbone comme les sucres, les alcools et les acides aminés (Vandamme *et al.*, 2007). En 2007, les génomes de 9 *Burkholderia* sp. étaient entièrement séquencés, 17 en cours de finition et 6 en projet de séquençage (Mahenthiralingam & Drevinek, 2007). Le génome a une taille moyenne de 7,5 Mb (un des plus grand parmi les bactéries de type gram négatif) et est organisé en deux réplicons (définis comme chromosomes) à l'exception de *B. xenovorans* et des membres du complexe *B. cepacia* qui en possèdent un troisième (Mahenthiralingam & Drevinek, 2007). Leur séquençage a d'ailleurs mis en évidence leur richesse en séquences d'insertion (nombre et diversité), reflétant ainsi leur étonnante capacité d'évolution.

Un certain nombre de *Burkholderia* sp. est connu pour être pathogène chez l'homme et les animaux (*B. mallei*, *B. pseudomallei* et les membres du complexe *B. cepacia*), ainsi que chez les plantes (*cf* paragraphe suivant). Cependant, de nombreuses études ont démontré que plusieurs souches possèdent d'excellentes aptitudes pour une utilisation en lutte biologique, bio-remédiation ou la promotion de croissance de leur plante hôte (Coenye & Vandamme, 2003 ; Deneff, 2007 ; Compant *et al.*, 2008b).

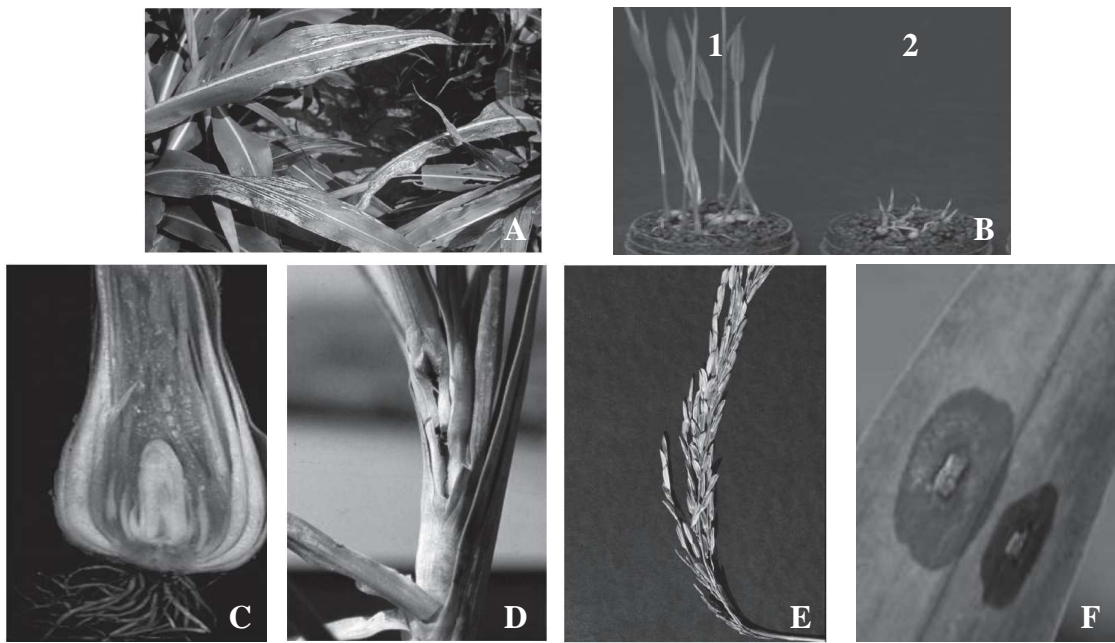


Fig. 32 : Exemples d'interaction entre les plantes et des *Burkholderia* sp. phytopathogènes. A : *B. andropogonis*-sorgho ; B : *B. plantarii*-riz (B1 : plant sain, B2 : plant malade) ; C : *B. cepacia*-oignon ; D : *B. caryophylli*-cèillet ; E : *B. glumae*-riz ; F : *B. gladioli*-orchidée (Gonzalez *et al.*, 2007).

## **4.2-Les *Burkholderia* sp. en interaction avec les plantes**

Bien que largement répandues dans la nature, ces bactéries sont surtout retrouvées en association avec les plantes.

### **4.2.1-Les *Burkholderia* sp. phytopathogènes**

Les *Burkholderia* sp. pathogènes sont responsables de nombreuses maladies telles que dépérissements, pourritures, développement de rouille ou malformations physiologiques (Fig. 32). *B. andropogonis* est responsable de la maladie des rayures du sorgho (Fig. 32.A) et des tâches foliaires chez les pois mascates (*Mucuna pruriens*). Elle est capable de coloniser plus de 52 espèces de plantes regroupées en 15 familles (Cothier *et al.*, 2004), telles que les céréales, le caféier, le trèfle. *B. caryophylli* peut infecter l'œillet à la suite de blessures. Les symptômes engendrés (galles ou dépérissement) par la bactérie sont fonction de la température (Fig. 32.D ; Gonzalez *et al.*, 2007). *B. cepacia* est responsable de la pelure glissante de l'oignon (Fig. 32.C). La pathogénicité est plus importante pour des températures supérieures à 30°C et est due à la sécrétion d'une endo-polygalacturonase (Parke & Gurian-Sherman, 2001). *B. gladioli* provoque la pourriture des orchidées (Fig. 32.F), de l'oignon et de l'iris (Keith *et al.*, 2005). Chez le riz, cette bactérie inhibe la prolifération de *B. glumae* et *B. plantarii* (Fig. 32.B et 32.E) qui sont responsables de la pourriture des grains et des plantules de riz (Miyagawa, 2000 ; Gonzalez *et al.*, 2007).

Les *Burkholderia* sp. pathogènes possèdent de nombreux facteurs de virulence extracellulaires qui leur permettent d'infecter une multitude de plantes hôtes. Différentes enzymes de dégradation des parois ont été reportées, notamment des polygalacturonases (*B. cepacia*, *B. caryophylli*, *B. gladioli* et *B. glumae*) et des cellulases (*B. caryophylli* ; Gonzalez *et al.*, 2007). De plus, la métallo-protéase ZmpA (responsable de protéolyses extracellulaires) peut être produite par certaines souches de *B. cenocepacia* (Wopperer *et al.*, 2006). Les bactéries peuvent également synthétiser des toxines, comme par exemple la toxoflavine et la tropolone par *B. glumae* et *B. plantarii* respectivement (Gonzalez *et al.*, 2007). Chez *Rhizopus microspora*, des études ont démontré que la rhizopine, toxine responsable de la pathogénicité, n'était pas synthétisée par le champignon mais par son agent symbiotique, *B. thailandensis* (Partida-Martinez & Hertweck, 2005).



## 4.2.2-Les *Burkholderia* sp. bénéfiques

### 4.2.2.1-Les souches rhizosphériques

Les *Burkholderia* sp. sont présentes dans le sol, mais c'est surtout au niveau de la rhizosphère et des racines qu'elles se concentrent (100 à 4000 fois plus que dans le sol ; Balandreau & Mavingui, 2007). La rhizosphère représente pour elles un environnement idéal par la richesse en nutriments (exsudats racinaires), leur permettant ainsi d'être retrouvées dans la rhizosphère de nombreuses plantes où elles peuvent représenter une forte proportion de la microflore totale cultivable : 88% pour le maïs (Hebbar *et al.*, 1992), 40% pour le riz (Tran Van *et al.*, 1996), 60% pour la cacahuète (Kokalis-Burelle *et al.*, 2002) et 25% pour la canne à sucre (Vogel *et al.*, 2002). Le maïs est la plante la plus étudiée du fait de la richesse de sa rhizosphère en *Burkholderia* sp. : certains membres du complexe *B. cepacia* (*B. ambifaria*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia* et parfois *B. vietnamiensis*), *B. graminis*, *B. tropica* et *B. unamae* (Cabalerro-Mellado *et al.*, 2004 ; Balandreau & Mavingui, 2007).

Certaines espèces rhizosphériques de *Burkholderia* sp. ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique (*B. vietnamiensis*, *B. unamae* et *B. kururiensis* ; Tran Van *et al.*, 1994 ; Estrada-de-los-Santos *et al.*, 2001 ; Cabalerro-Mellado *et al.*, 2004), de synthétiser des sidérophores (cépaciachéline, cépabactine et ornibactine) et des antibiotiques (Balandreau & Mavingui, 2007), ce qui leur confère un avantage certain pour la colonisation des niches rhizosphériques par rapport aux autres micro-organismes présents dans le sol.

### 4.2.2.2-Les *Burkholderia* sp. endophytes

Certaines espèces établissent une relation endophytique avec leur plante hôte. Par exemple, *B. cenocepacia* a été retrouvée en faible quantité dans le blé australien et le lupin (Balandreau *et al.*, 2001). D'autres souches ont été isolées à partir du caféier, du riz et de la pomme de terre (Baldani *et al.*, 1997). Par exemple, *B. vietnamiensis*, isolée pour la première fois dans des racines de plants de riz, a également été retrouvée dans le maïs, le caféier et la canne à sucre (Estrada *et al.*, 2002). Au Mexique, *B. tropica* colonise en grande quantité le maïs sans développement de symptômes néfastes (Balandreau & Mavingui, 2007), mais cette espèce n'a pas été retrouvée en Europe. *B. phytofirmans* souche PsJN (Sessitsch *et al.*, 2005),



isolée à partir de racines d'oignon, est capable de coloniser diverses plantes comme la tomate, la pomme de terre et la vigne (*cf* paragraphe 4.3).

#### 4.2.2.3-Les *Burkholderia* sp. symbiotiques

Les espèces symbiotiques vont engendrer ou favoriser la formation de nodules racinaires et foliaires. Il a été reporté que le champignon *Frankia* sp. associé à *B. cepacia* permet d'augmenter le nombre de nodules formés sur les racines (jusqu'à 4 fois) chez l'aulne (Balandreau & Mavingui, 2007). Une souche de *Burkholderia* sp. a également été extraite de nodules racinaires d'*Aspalathus carnosa* (légume sud-africain). Des espèces proches phylogénétiquement de *B. kururiensis* et *B. graminis* ont été isolées dans des nodules racinaires de *Machaerium lunatum*. Celles-ci ont la capacité de former des nodules bien qu'inactives chez *Macroptilium atropurpureum* car elles possèdent des gènes *nif* et *nod* comparables à ceux identifiés chez *Rhizobium* sp. D'autres espèces, comme *B. caribensis*, *B. dolosa*, *B. phymatum* et *B. tuberum*, ont également montré de telles capacités (Vandamme *et al.*, 2002).

Les nodules foliaires sont des cavités formées sur la face inférieure de quelques *Rubiaceae*, comme les *Psychotria* sp. par exemple. Une étude menée par Van Oevelen *et al.* (2002), basée sur l'amplification de l'ADNr 16S des eubactéries, a démontré que les seuls amplicons obtenus à partir des nodules foliaires étaient affiliés au genre *Burkholderia*, et qu'aucun amplicon n'avait été obtenu pour les autres tissus.

Enfin, certaines souches peuvent établir une relation symbiotique avec des champignons. C'est notamment le cas de *Gigaspora margarita*, *Scutellospora* sp. et *Rhizopus* sp. où des *Burkholderia* sp. ont été retrouvées comme parasites obligatoires dans les hyphes et les spores (Balandreau & Mavingui, 2007). *Burkholderia* sp. EJP67 augmente le phénomène de mycorhization du système symbiotique *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* lorsque celle-ci est présente dans le champignon, l'augmentation de la mycorrhization étant dépendante de la densité bactérienne (Aspray *et al.*, 2006).





#### 4.2.2.4-Les effets sur les plantes

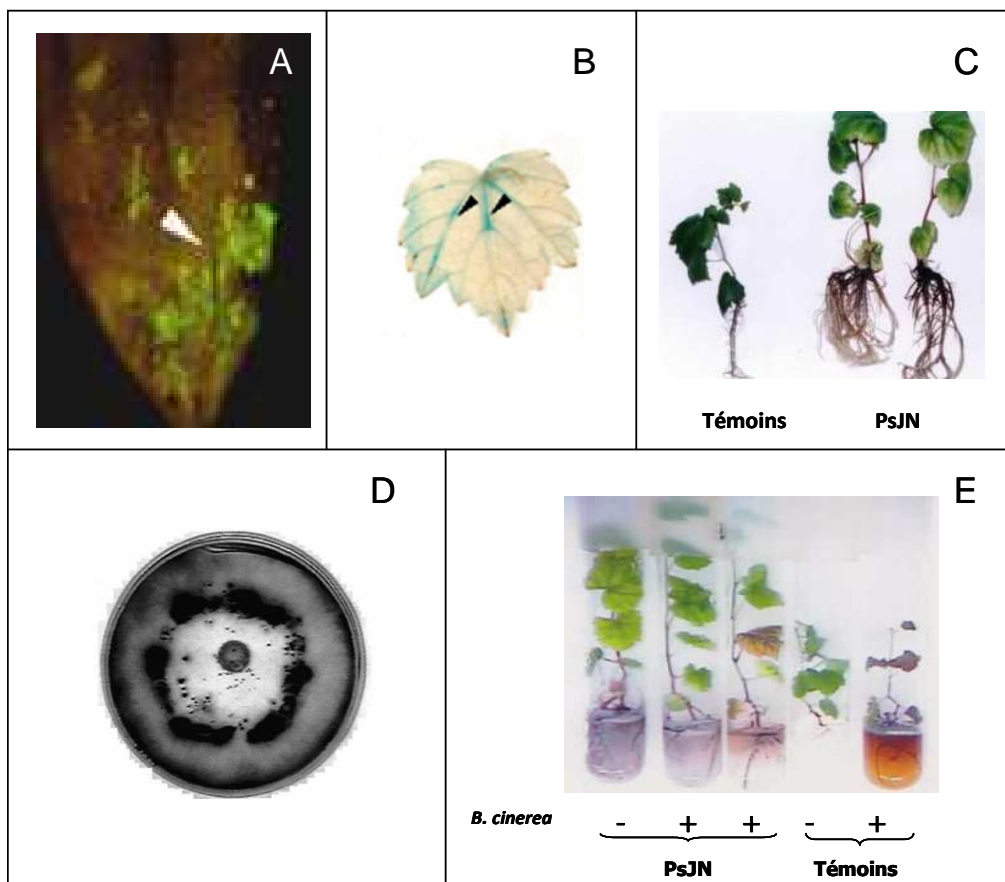
L'interaction *Burkholderia* sp./plante est responsable de diverses modifications environnementales ou physiologiques chez la plante hôte. La richesse de leur génome et la diversité des niches écologiques où ces bactéries ont été isolées rendent leur utilisation possible en biotechnologie végétale et lutte biologique (Balandreau & Mavingui, 2007), ainsi qu'en phyto-remédiation (Denef, 2007).

De nombreuses souches sont capables de fixer l'azote par la présence du locus *nif*, ce qui améliore les apports azotés de la plante : *B. vietnamiensis*, *B. kururiensis*, *B. tropica*, *B. unamae* (Tran Van *et al.*, 1996 ; Estrada-de-los-Santos *et al.*, 2001 ; Vandamme *et al.*, 2002 ; Balandreau & Mavingui, 2007). De plus, ces bactéries peuvent synthétiser des hormones directement utilisables par la plante telles que l'auxine (Balandreau & Mavingui, 2007). Par exemple, les *Psychotria* sp. produisent du diméthyl-tryptamine et la tryptamine peut être utilisée comme source de carbone par toutes les *Burkholderia* sp. (Balandreau & Mavingui, 2007) ou comme précurseur de l'auxine (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Les *Burkholderia* sp. synthétisent une large gamme d'antibiotiques ou de composés à activité antimicrobienne permettant de réduire ou d'annihiler le développement d'agents pathogènes chez la plante : bactériocine, hydroxythréonine, ornibactines, cépacidines, altéricidines, monobactames ainsi que des dérivés de la rhizobitoxine, du résorcinol, de la quinoline, de la phénazine (Balandreau & Mavingui, 2007).

### **4.3- *Burkholderia phytofirmans* sp. nov. souche PsJN**

#### **4.3.1-Caractérisation et propriétés**

*Burkholderia phytofirmans* souche PsJN a été isolée à partir de racines d'oignon stérilisées infectées par *Glomus vesiculiferum* (Frommel *et al.*, 1991). Tout d'abord affiliée aux *Pseudomonas* sp. non-fluorescents, elle fut par la suite reclassée en *B. phytofirmans* sp. nov. souche PsJN par Sessitsch *et al.* (2005). Cette bactérie possède une forte activité ACC déaminase qui permet de réduire la teneur en éthylène responsable de l'inhibition de l'élongation racinaire, permettant ainsi d'augmenter le développement racinaire et donc la



**Fig. 33** : Interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN. A : colonisation du rhizoplan ; B : présence de la bactérie dans les feuilles après inoculation des racines par la souche PsJN marquée au gène *gus* ; C : promotion de la croissance ; D : antagonisme envers *B. cinerea* ; E : protection contre *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002 ; Compant *et al.*, 2008a).

croissance de la plante (Sessitsch *et al.*, 2005). Une description détaillée de cette bactérie est présentée par Sessitsch *et al.* (2005).

*B. phytofirmans* souche PsJN est capable d'établir des populations rhizosphériques et endophytiques avec un grand nombre de plantes : pomme de terre, tomate, concombre, pois chiches, pastèque, plants de riz, sphaigne (Frommel *et al.*, 1991 & 1993 ; Pillay & Nowak, 1997 ; Nowak, 1998 ; Salles *et al.*, 2006 ; Muthukumarasamy *et al.*, 2007). Cette interaction avec les plantes aboutit à la stimulation de leur croissance (Nowak, 1998), et peut également induire une protection contre certains agents pathogènes. Par exemple, la souche PsJN protège la tomate contre *Verticillium dahliae* (Sharma & Nowak, 1998) et possède aussi des propriétés antagonistes envers *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2000).

Le génome de cette bactérie a été récemment séquencé ([www.burkholderia.com](http://www.burkholderia.com)), ce qui offre de nouvelles perspectives d'étude dans l'interaction plantes-souche PsJN par l'utilisation de mutants bactériens. Différentes études ont déjà été menées avec des souches mutées de la bactérie sur diverses plantes. Chez la pomme de terre, le mutant *B. phytofirmans* H41, dont le gène muté possède 66% d'homologie avec le gène *nadc* codant une quinolate phosphoribosyltransférase chez *Ralstonia solanacearum*, colonise de manière similaire aux souches sauvages la plante mais ne promouvoit pas sa croissance (Wang *et al.*, 2006b). Les mutants *acds*, qui ont perdu leur capacité ACC deaminase, montrent une synthèse plus importante d'AIA, une diminution de la production de sidérophores et sont incapables de stimuler l'élongation racinaire chez le colza (Sun *et al.*, 2009).

#### **4.3.2-L'interaction vigne-*B. phytofirmans* souche PsJN**

La souche PsJN est capable d'établir des populations rhizosphériques et endophytiques sur des racines de vitroplants et boutures (Fig. 33.A) après inoculation, ainsi que diffuser jusqu'aux feuilles (Fig. 33.B) et inflorescences *via* les vaisseaux du xylème (Compant *et al.*, 2005b & 2008a). La colonisation de la vigne par PsJN promouvoit la croissance de la plante (Fig. 33.C) et induit un renforcement de la paroi cellulaire des racines et du xylème ainsi qu'une accumulation de composés phénoliques dans les racines (Compant *et al.*, 2007). La bactérie possède une activité antagoniste *in vivo* envers *B. cinerea* (Fig. 33.D) et induit également *in vitro* une protection contre *B. cinerea* (Fig. 33.E ; Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002 ; Compant, 2007). De plus, cette bactérie protège la plante contre le froid : une



accumulation plus importante de proline, d'amidon et de composés phénoliques chez les plantes bactérisées a été observée (Ait Barka *et al.*, 2006).

## **5-Déroulement de la thèse**

Initialement, cette thèse portait sur deux sujets : l'étude des défenses dans le bois de vigne suite à l'inoculation des plantes par la bactérie endophyte *B. phytofirmans* souche PsJN et la compréhension de l'interaction entre cette bactérie et *A. thaliana*.

À ce jour, aucun traitement efficace n'est disponible pour lutter contre les pathogènes responsables de l'ESCA (maladie du bois). Des tests *in vitro* ont révélé que PsJN ne possède pas de propriétés antagonistes envers les champignons impliqués dans l'ESCA (collection du laboratoire). Cependant, comme la bactérie PsJN induit l'expression de gènes de défense dans les racines et les inflorescences suite à l'inoculation des racines (Compant, 2007), mon travail consistait à déterminer si ceux-ci le sont également dans le bois, car une telle réponse pourrait être une solution alternative pour lutter contre cette maladie. Afin d'étudier l'expression des gènes de défense par PCR quantitative, un protocole d'extraction d'ARN (basé sur l'utilisation du réactif 'Plant RNA') à partir de bois a été mis au point (Annexe-Publication5). De nombreuses difficultés ont été rencontrées afin de reproduire tout d'abord le protocole de bactérisation établi au laboratoire. Plusieurs ajustements ont été réalisés afin d'obtenir une colonisation du rhizoplan (100 % des plants) voire une colonisation endophytique des racines (variation importante entre les plantes) par PsJN. Bien que l'induction de l'expression de gènes de défense ait été observée dans les racines et feuilles, nous n'avons pu obtenir de tels résultats dans le bois. Par ailleurs, la qualité physiologique des boutures que nous avons à notre disposition après la première année de thèse ne nous a pas permis de réitérer ces expériences dans des conditions optimales.

En parallèle de cette thématique, nous avons également travaillé sur l'interaction *A. thaliana*-*B. phytofirmans* souche PsJN afin de déterminer les mécanismes impliqués dans l'établissement de la protection contre le froid et *B. cinerea* chez la vigne (par extrapolation). La première étape de ce projet consistait à mettre au point un protocole de bactérisation d'*A. thaliana* par la souche PsJN. Les expériences menées ont démontré que la souche PsJN est capable de coloniser les racines, d'y pénétrer en moins de 24 heures (colonisation



endophytique) et de stimuler la croissance de la plante. Cependant, la bactérie ne semble pas être capable de diffuser jusqu'aux feuilles. De plus, la présence de la bactérie ne confère à la plante aucune protection contre *B. cinerea*, et nous n'avons observé aucune potentialisation de l'expression de gènes de défense (*CBF1-3*, *PR-1*) en réponse à un stress froid.

Étant donné ces différents résultats, nous avons décidé de changer le sujet de la thèse. Ainsi, nous avons étudié les événements engendrés localement lors de la perception de la bactérie par la vigne (cultures cellulaires) et les mécanismes de défense impliqués dans la protection de la plante contre le froid et *B. cinerea* (vitroplants).

## **6-Objectifs de la thèse**

La vigne, comme toutes les plantes cultivées, est sensible à différents agents pathogènes. La lutte chimique utilisée actuellement est certes efficace sur un grand nombre de ces pathogènes mais son utilisation répétitive et massive (la viticulture consomme entre 30 et 50 % des pesticides utilisés en France) a induit notamment une pollution environnementale et l'apparition de souches pathogènes résistantes. De plus, pour lutter contre d'autres pathologies comme celles du bois de la vigne, les viticulteurs ne disposent actuellement d'aucun traitement efficace. La profession viticole se retrouve donc dans une situation paradoxale avec, selon les pathologies, l'application d'un nombre très élevé de produits phytosanitaires (cas de l'oïdium et du mildiou) ou, à l'inverse, l'absence de traitement connu. Compte-tenu de l'objectif fixé par le Grenelle de l'environnement visant à réduire de moitié les traitements pesticides entre 2008 et 2018 (programme Ecophyto 2018), il est primordial de développer dès maintenant de nouvelles stratégies de protection des plantes. Parmi ces solutions alternatives, la lutte biologique et plus particulièrement la stimulation des défenses naturelles de la plante par des micro-organismes ou des éliciteurs, est actuellement en plein essor. Une des propriétés intéressantes des PGPRs réside dans leur capacité à induire des réactions de défense qui peuvent être à l'origine de la résistance systémique induite (ISR), conférant ainsi à la plante une protection vis-à-vis des agents pathogènes.

Plusieurs études menées au laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, ont porté ces dernières années sur l'interaction entre *B. phytofirmans* souche PsJN et la vigne. La souche PsJN est capable de coloniser le rhizoplan, de pénétrer dans les racines et de

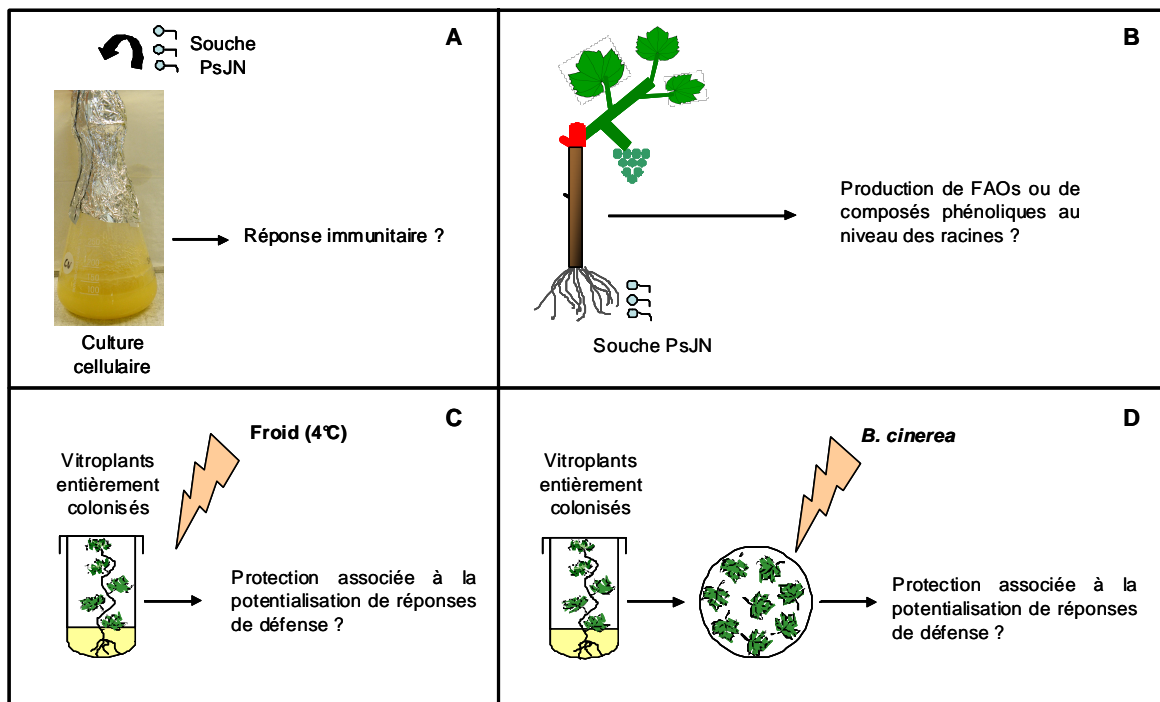


Fig. 34 : Illustrations des objectifs de la thèse. La présence de *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN induit-elle une réponse immunitaire sur des cultures cellulaires (A) et sur des racines de boutures au niveau local (B) ? La souche PsJN protège des vitroplants entièrement bactérisés contre le froid (C) ou *B. cinerea* (D) par la potentialisation de réponses de défense ? FAOs : formes actives de l'oxygène.



diffuser dans les autres organes de la plante (Compant *et al.*, 2005a & 2008a). De plus, cette PGPR promouvoit la croissance de la vigne et protège la plante contre le froid et *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2000, 2002 & 2006). Compte-tenu du potentiel bénéfique de cette interaction, il apparaît nécessaire de mieux comprendre la nature de cette interaction. Effectivement, certaines questions n'ont toujours pas été élucidées :

- Comment la bactérie est-elle perçue localement par la plante ?
- Quels sont les mécanismes impliqués dans la mise en place de la résistance lorsque la vigne est soumise à un stress froid (4°C) ou attaquée par *B. cinerea* ?
- La présence de la bactérie localement est-elle nécessaire pour induire les mécanismes de défense et/ou protéger la vigne ?
- La protection est-elle associée à la potentialisation des mécanismes de défense ?

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour but d'apporter des réponses à ces questions (Fig. 34).

## **Chapitre 1 : l'interaction entre *B. phytofirmans* souche PsJN et la vigne engendre-t-elle une réponse immunitaire au niveau local ?**

Bien que l'induction d'une résistance systémique (ISR) par les PGPRs soit bien documentée (*cf* paragraphe 2.6.2), peu de données existent sur les réponses de défense mises en place par la plante au niveau local, c'est-à-dire lorsque la cellule végétale est au contact de la bactérie. En effet, lors de la perception d'un agent pathogène ou d'un stress abiotique, les événements précoces (*cf* paragraphe 2.3) sont parmi les premiers éléments de défense mis en place par la plante. Ils sont par la suite responsables de l'activation d'une cascade de réactions qui aboutit à la mise en place de réponses de défense tant au niveau local qu'au niveau systémique. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la perception de *B. phytofirmans* souche PsJN par des suspensions cellulaires de vigne afin de déterminer si cette interaction engendre des réponses de défense au niveau local.



**Publication 1** : Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., Ait Barka E., Kauffmann S., Jeandet P., Clément C., Baillieul F. et Dorey S. (2010).

**Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* in grapevine cell suspensions.** *Journal of Experimental Botany*, doi : 10.1093/jxb/erq291.

Dans cette étude, nous avons utilisé des suspensions cellulaires de vigne (cépage chardonnay) afin d'analyser les événements précoces (alcalinisation, production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et mort cellulaire), la production d'AS et l'expression de plusieurs gènes de défense dans les cellules lorsque celles-ci sont mises au contact de *B. phytofirmans* souche PsJN. De plus, les résultats obtenus ont été comparés avec les réponses de défense mises en place par la plante lors de l'interaction avec l'agent non-hôte *P. syringae* pv. *lisi* (réaction incompatible ; Robert *et al.*, 2001 & 2002).

**Publication 2** : Bordiec S. \*, Compant S. \*, Clément C., Dhondt S. et Ait Barka E. (\*co-1<sup>er</sup> auteur)

**Phenolic compound accumulation and ROS production in roots of *Vitis vinifera* L. colonized by the endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN.** Résultats complémentaires.

En complément de l'étude précédente, la production de FAOs a été évaluée cette fois-ci sur le modèle bouture, qui est le modèle d'étude se rapprochant le plus de la vigne en condition naturelle (vignoble). Par microscopie, la production de FAOs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et NO) ainsi que l'accumulation de composés phénoliques dans des racines de boutures à la suite de l'inoculation des racines par la souche PsJN ont été étudiées.

## **Chapitre 2 : caractérisation de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN lorsque la plante est exposée au froid**

Ait Barka *et al.* (2006) ont démontré que la souche PsJN est capable de protéger la vigne contre le froid (4°C). Cette protection a notamment été corrélée à une accumulation plus importante d'amidon, de proline et de composés phénoliques. Néanmoins, ces analyses



ont été réalisées deux semaines après l'exposition des plantes à 4°C, c'est-à-dire qu'il s'agit davantage d'un contexte d'acclimatation que d'un stress froid. De plus, d'autres réponses de défense mises en place par la plante à la suite d'un stress froid (cf paragraphe 2.4.5) n'ont pas été étudiées. Ainsi, nous avons caractérisé l'interaction vigne-*B. phytofirmans* souche PsJN dès le début de l'exposition des plantes au froid.

**Publication 3** : Theocharis A.\*, Bordiec S.\*, Fernandez O., Paquis S., Dhondt S., Baillieul F., Ait Barka E. et Clément C. (\*co-1<sup>er</sup> auteur)

**Priming *Vitis vinifera* L. with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is correlated to better acclimation to low non-freezing temperatures.** Soumise à *Physiologia Plantarum*.

Afin de compléter ces travaux, des vitroplants entièrement colonisés par la souche PsJN ont été soumis à un stress froid (4°C). L'expression de gènes impliqués dans les réponses de défense à la suite d'un stress (marqueur froid, protéines PR, voies de signalisation et phytoalexines) ainsi que des marqueurs physiologiques (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proline, aldéhydes et malondialdéhydes) ont été analysés dans les feuilles afin de déterminer si cette PGPR a une influence sur leur taux d'induction et leur teneur, et si la résistance observée peut être également liée à leur potentialisation.

### **Chapitre 3 : caractérisation de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN lorsque la plante est attaquée par *B. cinerea***

Ait Barka *et al.* (2000 & 2002) ont démontré que la souche PsJN est capable d'induire une protection envers *B. cinerea* chez des vitroplants entiers, cependant les mécanismes impliqués dans l'établissement de cette résistance n'ont pas été déterminés à ce jour.

**Publication 4** : Bordiec S., Jacquens L., Conreux A., Jeandet P., Clément C., Baillieul F., Dhondt S. et Ait Barka E.

**Protection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) against *B. cinerea* by the endophytic PGPR *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is associated with higher phytoalexin accumulation but not with priming of defense-related gene expression.** En préparation.



L'objectif de cette étude est de déterminer si la protection est due à la potentialisation des réponses de défense. Pour cela, des feuilles prélevées à partir de vitroplants entièrement bactérisés ont été inoculées par *B. cinerea*. L'effet protecteur de la souche PsJN sur le développement des nécroses, l'expression de gènes de défense et l'accumulation de phytoalexines (le resvératrol et son dimère  $\epsilon$ -viniférine) ont été analysés.





## RESULTATS



## Chapitre 1

L'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN engendre-t-elle une réponse immunitaire au niveau local ?



## **Publication 1**

### **Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* in grapevine cell suspensions**

Sophie Bordiec<sup>1</sup>, Sandra Paquis<sup>1</sup>, Hélène Lacroix<sup>1</sup>, Sandrine Dhondt<sup>1</sup>, Essaïd Ait Barka<sup>1</sup>, Serge Kauffmann<sup>2</sup>, Philippe Jeandet<sup>3</sup>, Florence Mazeyrat-Gourbeyre<sup>1</sup>, Christophe Clément<sup>1</sup>, Fabienne Baillieul<sup>1</sup>, Stéphan Dorey<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire Stress, Défense et Reproduction des Plantes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

<sup>2</sup> Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du C.N.R.S., Université Louis Pasteur, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

<sup>3</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

*Journal of Experimental Botany*, sous presse



**Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions**

(Journal of Experimental Botany, in press)

Sophie Bordiec<sup>1</sup>, Sandra Paquis<sup>1</sup>, Hélène Lacroix<sup>1</sup>, Sandrine Dhondt<sup>1</sup>, Essaïd Ait Barka<sup>1</sup>, Serge Kauffmann<sup>2</sup>, Philippe Jeandet<sup>3</sup>, Florence Mazeyrat-Gourbeyre<sup>1</sup>, Christophe Clément<sup>1</sup>, Fabienne Baillieul<sup>1</sup>, Stéphan Dorey<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire Stress, Défense et Reproduction des Plantes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

<sup>2</sup> Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du C.N.R.S., Université Louis Pasteur, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

<sup>3</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

Author for correspondence: Stéphan Dorey (stephan.dorey@univ-reims.fr), Tel: +33 3 26 91 85 87/Fax: +33 3 26 91 34 27

## ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are beneficial microorganisms that colonize rhizosphere of many plant species and confer beneficial effects, such as increase of plant growth. PGPR are also well known as inducers of systemic resistance to pathogens in plants. However molecular mechanisms involved locally after direct perception of these bacteria by plant cells still remain largely unknown. *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is an endophytic PGPR that colonizes grapevine and protects the plant against gray mold disease caused by *Botrytis cinerea*. This report focuses on local defence events induced by *B. phytofirmans* PsJN after perception by grapevine cells. We demonstrated that, after addition to cell suspension cultures, the bacteria were tightly attaching

to plant cells in a way similar to the grapevine non-host bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *B. phytofirmans* PsJN perception led to a transient and monophasic extracellular alkalisation but we did not detect any accumulation of reactive oxygen species nor cell death. By contrast, challenge with *P. syringae* pv. *pisi* induced a sustained and biphasic extracellular alkalisation, a two phases oxidative burst and a HR-like response. Perception of the PGPR also led to the production of salicylic acid (SA) and the expression of a battery of defence genes that was however weaker in intensity compared to defence gene expression triggered by the non-host bacteria. Some defence genes up-regulated after *B. phytofirmans* PsJN challenge are specifically induced by exogenous treatment with SA or jasmonic acid, suggesting that both signalling pathways are activated by the PGPR in grapevine.

**KEYWORDS:** defence genes, early signalling, grapevine, growth-promoting rhizobacteria, non-host bacteria.

## INTRODUCTION

Plants strongly rely on an innate immune system to defend themselves against pathogenic microorganism invasion. This system is based on the capacity to perceive the intruder as 'non-self' and ends up in the activation of a wide range of defence responses. These defence responses are essential for the success of plant resistance and therefore contribute to plant immunity (Boller and Felix, 2009). Early responses in plant/microorganism interactions are characterized by signalling processes including ion fluxes, MAP kinase cascade activation and production of reactive oxygen species (ROS) (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Key signal molecules including salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) are also produced within hours

after pathogen challenge. These signal molecules participate in the regulation of downstream defence genes (Mur *et al.*, 2006; Browse, 2009; Vlot *et al.*, 2009). Ultimately, plant defence responses encompass the strengthening of cell walls and the production of antimicrobial compounds that altogether play a key role in pathogen restriction (Hammond-Kosack and Jones, 1996). In some cases, the interaction ends up in local plant cell death characteristic of the so-called hypersensitive reaction (HR) (Heath, 2000).

Albeit plant defence responses can be typically triggered by recognition of phytopathogenic microorganisms, they can also be stimulated by non-pathogenic strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Van Wees *et al.*, 2008; Lugtenberg and Kamilova, 2009).





PGPR are able to colonize the rhizosphere of many plant species and to confer beneficial effects, such as increased plant growth and reduced susceptibility to diseases caused by plant pathogenic fungi, bacteria, viruses and nematodes (Compant *et al.*, 2008a). Some of these PGPR are endophytic since they can penetrate root tissues and sometimes diffuse through vessels to other plant organs (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006; Compant *et al.*, 2008b; Hardoim *et al.*, 2008). PGPR have been separated into two groups, (i) the extracellular PGPR (ePGPR) that colonize the rhizosphere, the rhizoplane or the spaces between cells of the root cortex and (ii) the intracellular PGPR (iPGPR), which exist inside root cells, generally in specialized nodular structures (Gray and Smith, 2005). The biological control activity of PGPR is exerted either directly through antagonism of pathogen development or indirectly by eliciting a plant-mediated resistance response (Van Wees *et al.*, 2008; Lugtenberg and Kamilova, 2009). PGPR are able to trigger induced systemic response (ISR), a defence state that takes place in the entire plant and prepares the host to respond to a broad range of pathogen attacks (van Loon *et al.*, 1998; Bloemberg and Lugtenberg, 2001; Van Wees *et al.*, 2008). In *Arabidopsis thaliana*, ISR triggered by root-colonizing strains of *Pseudomonas fluorescens* was shown to be ethylene and JA dependent but SA independent (Knoester *et al.*, 1999; Ton *et al.*, 2002; Iavicoli *et al.*, 2003). However, ISR triggered by some specific strains of PGPR may also involve SA signalling (Zhang *et al.*, 2002). Although the systemic induction of resistance by PGPR is well documented, little data are available on local defence events taking place in plant cells directly in contact with these bacteria. Moreover, no direct comparison has been made between defence responses induced by PGPR and typical defence reactions occurring during non-host or incompatible interactions triggered by bacteria.

*Burkholderia phytofirmans* strain PsJN, isolated from surface-sterilized onion roots (Frommel *et al.*, 1991; Sessitsch *et al.*, 2005), is a natural endophytic, non-nodulating PGPR strain of potato and tomato (Frommel *et al.*, 1991, 1993; Pillay and Nowak, 1997) and can be classified as a ePGPR (Gray and Smith, 2005). This bacterium is also able to colonize and diffuse inside grapevine tissues and to travel through xylem vessels in the different organs of the plant (Compant *et al.*, 2005; Compant *et al.*, 2008b). Moreover, *B. phytofirmans* PsJN colonisation enhanced protection against *Verticillium* sp. in tomato (Sharma and Nowak, 1998) and *Botrytis cinerea* in grapevine (Ait Barka *et al.*, 2000; Ait Barka *et al.*, 2002). In this paper, we compared defence reactions induced in grapevine cells by *B. phytofirmans* PsJN and the non-host bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. *P. syringae* pv. *pisi* is known to activate an innate immune response when infiltrated in *Vitis vinifera* plants (Robert *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 2002). Here we demonstrate that whereas both bacteria physically interact with plant cells, *B.*

*phytofirmans* PsJN perception triggers a local immune response, which is significantly weaker in intensity than the one occurring during the non-host interaction.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant cell culture

Cell suspensions of 41B (*V. vinifera* L. cv. Chasselas x *V. berlandieri*) were cultured in Murashige-Skoog medium (pH 5.8) containing vitamins (x 1.5), sucrose (30 g.l<sup>-1</sup>), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, 0.2 mg.l<sup>-1</sup>), 6-benzylaminopurine (BAP, 0.5 mg.l<sup>-1</sup>) and were propagated in the dark at 25°C under shaking at 120 rpm. They were subcultured every 7 days to be maintained in exponential phase. For experiments, 30 ml of cells subcultured for 6 days were used. Before any treatment, cells were allowed to adjust to the new condition overnight.

### Microorganisms and plant assays

*P. syringae* pv. *pisi* and *B. phytofirmans* strain PsJN were grown in 100 ml King's B liquid medium at 28°C, on a rotary shaker (150 rpm). *Escherichia coli* that was used as negative control in some experiments was grown in 100 ml Luria-Bertani liquid medium at 37°C. Overnight cultures of bacteria were used for experiments. Bacteria were collected by centrifugation (4,500 g, 10 min) and washed with sterile MgCl<sub>2</sub> (10 mM). After inoculation, final bacterial concentration in cell suspension cultures was 10<sup>7</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>.

### Phytohormone treatments

Methyl jasmonate (MeJA) was purchased from Sigma-Aldrich-Chimie (Saint-Quentin-Fallavier, France). Sodium salicylate (SA) was purchased from Eurobio (Les Ulis, France). SA was dissolved in water and MeJA was dissolved in 10% ethanol prior dilution in water. Final concentrations of chemicals in cell suspension cultures were 1 mM for SA and 200 µM for MeJA. Equivalent volume of 10% ethanol was added to control cells to ensure that it did not interfere with the experiments. Final ethanol solutions did not exceed 0.1% (v/v).

### Microscopy and cell death assay

Grapevine plant cells inoculated with *B. phytofirmans* PsJN, *P. syringae* pv. *pisi* or *E. coli* were observed under epifluorescence microscope during a 24 h time-course. Just before each microscopic observation, challenged cell suspension cultures were incubated 2 min in a solution of acridine orange (0.1%, pH 7) in order to visualize the bacteria (Monier and Lindow, 2004). Pictures were captured 1 h and 24 h post inoculation. Cell death was monitored as described by Levine *et al.* (1994). For each sample, a 500 µl aliquot of cells was incubated with 0.05% Evan's blue for 15 min and then washed extensively. The dye



bound to dead cells was solubilised in 50% methanol with 1% SDS for 30 min at 50°C and quantified by spectrometry using optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>). In our experiments, 0.5 OD<sub>600</sub> corresponded to 25 % of dead cells.

#### Medium alkalisation, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and SA analysis

Medium alkalisation measurement was performed according to Felix *et al.* (1993) using a standard pH-meter (Basic, Denver Instrument, Gottingen, Germany). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was analysed according to Varnier *et al.* (2009). Briefly, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in the culture medium was measured as the chemiluminescence of luminol. Luminescence, expressed in rlu, is proportional to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (linearity range 1 µM-1 mM). In our plant system, 12 000 rlu correspond to a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration of 25 µM. Free SA was extracted from dried grapevine cells using methanol 90% and SA accumulation was analysed by HPLC according to Dorey *et al.* (1997).

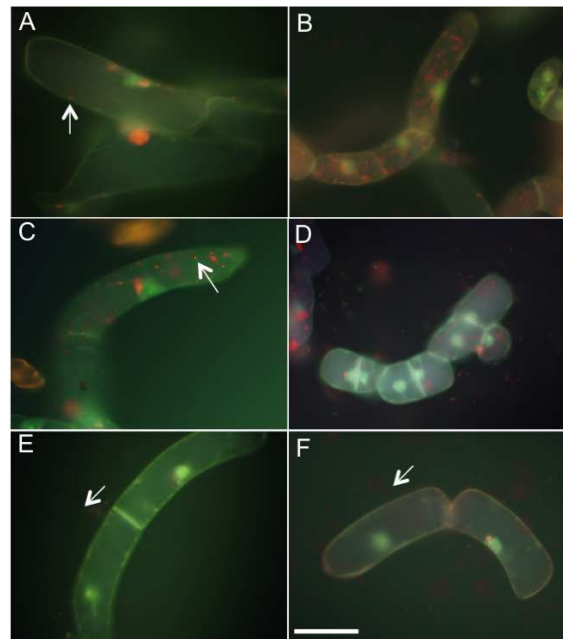
#### RNA extraction and real-time PCR analysis

RNA extraction and RT-qPCR were performed as previously described in Varnier *et al.* (2009). Sequences of defence gene primers used for RT-qPCR were previously described in Aziz *et al.* (2003) except for *VvI7.3* (accession number XM\_002283642.1: 5'-GTACCATCAGACCACCCATAAGTAGTG-3' and 5'-AGACCAACGGCAAATCAAGTG-3').

## RESULTS

#### *B. phytofirmans* PsJN and *P. syringae* pv. *pisi* physically interact with grapevine cells

Successful endophytic PGPR are known to approach plant roots *via* chemotaxis-induced motility and effectively colonize plant tissues *via* attachment (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007; Haroim *et al.*, 2008). Plant cell attachment of phytopathogenic bacteria is also an essential step for colonisation, especially allowing the translocation of effectors *via* type III secretion system (T3SS) and pilus-like structure formation (Aldon *et al.*, 2000; Buttner and Bonas, 2006). We first compared the behaviour of *B. phytofirmans* PsJN and *P. syringae* pv. *pisi* when added to grapevine cell suspensions. *E. coli* was used as negative control in these experiments. We observed the physical interaction by microscopy under epifluorescence over 24 hours. At time 0, all the bacteria were in the vicinity of plant cells but not directly in contact (data not shown). Few *B. phytofirmans* PsJN or *P. syringae* pv. *pisi* bacteria were in contact with plant cells as soon as 5 min after challenge (data not shown). A large number of both bacteria were found to interact with plant cells at 1 h (Figs. 1 A,C). Most of plant cells were covered by *B. phytofirmans* PsJN or *P. syringae* pv. *pisi* 24 h after challenge



**Figure 1.** Interactions of bacteria with grapevine cell suspensions. Plant cells were incubated with *B. phytofirmans* PsJN (A,B), *P. syringae* pv. *pisi* (C,D) and *E. coli* (E,F). Pictures were captured at 1 hour (A,C,E) and 24 h (B,D,F) after challenge. Bacteria were stained by acridine orange. Arrows represent individual bacteria. Bar = 50 µm. Experiments have been done at least three times with similar results.

(Figs. 1 B,D). By contrast, *E. coli* did not stick to the plant cells even 24 h post inoculation (Figs. 1 E,F).

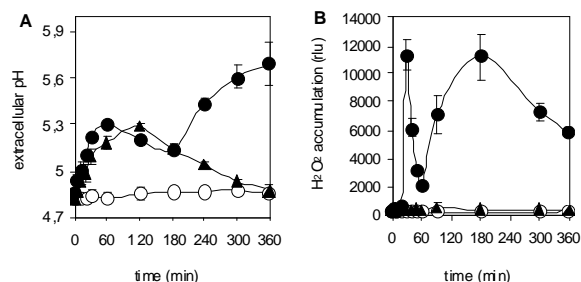
#### Extracellular medium alkalization of grapevine cells after *B. phytofirmans* PsJN and *P. syringae* pv. *pisi* perception

Among early signalling events, extracellular alkalization has been shown to be essential component of ion fluxes involved in plant defence (Felix *et al.*, 1993; van Loon *et al.*, 2008). Moreover, alkalization measurement has been used as an efficient method to monitor chemosensory perception in cultured plant cells (Felix *et al.*, 1993). Grapevine cell suspensions incubated with *B. phytofirmans* PsJN produced a monophasic and transient burst of alkalization that started within the first min of the interaction and culminated at 2 h (Fig. 2A). By contrast, cell suspensions treated with *P. syringae* pv. *pisi* produced a two-phased alkalization response with a first peak culminating within 1 h, followed by a second and sustained phase lasting for several hours (Fig. 2A).

#### *P. syringae* pv. *pisi* but not *B. phytofirmans* PsJN induces an oxidative burst and cell death in grapevine cells

Early signalling events in plant defence often include a rapid and intense production of ROS (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Grapevine cell suspensions incubated with *P. syringae* pv. *pisi* produced a two-phased oxidative burst (Fig. 2B). The first phase started after 15 min and culminated at 30 min. A second and sustained peak of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was detected after few hours with a

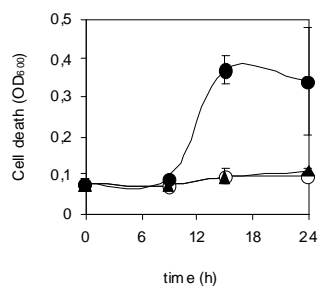




**Figure 2.** Early events induced by *B. phytofirmans* PsJN and *P. syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. Medium alkalinisation (A) or accumulation of reactive oxygen species (B) in grapevine cells treated with  $MgCl_2$  (open circles), challenged with *B. phytofirmans* PsJN (closed triangles) or *P. syringae* pv. *pisi* (closed circles).  $H_2O_2$  production was determined using chemiluminescence of luminol. Chemiluminescence was integrated and expressed in relative light units (rlu). Data presented are means of triplicate experiments  $\pm$  SD.

maximum at 3 h. This two-peak profile is reminiscent to the one observed for the extracellular alkalinization. Interestingly, no significant accumulation of  $H_2O_2$  was detected in cell suspension medium after challenge with *B. phytofirmans* PsJN (Fig. 2B).

Cell death process is often associated with the oxidative burst (Torres *et al.*, 2006). As shown in Fig. 3, cell death in cell suspensions was detected as soon as 9 h and a plateau was observed at 15 h after *P. syringae* pv. *pisi* inoculation. By contrast, no cell death was detected over the time-course after *B. phytofirmans* PsJN challenge.



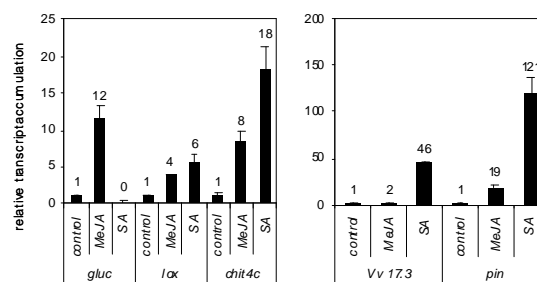
**Figure 3.** Cell death assays. Cells were challenged with  $MgCl_2$  (open circles), *B. phytofirmans* PsJN (closed triangles) and *P. syringae* pv. *pisi* (closed circles). Quantitative measurement of cell death was performed by Evan's blue staining. Data presented are means of triplicate experiments  $\pm$  SD.

#### Expression profiles of grapevine defence genes after signal molecule perception or bacterial challenge

In order to compare grapevine gene expression profiles after PGPR and non-host bacteria challenge, we selected several markers covering a large set of defence classes. Three PR protein genes, an acidic chitinase (*chit4c*), a basic glucanase (*gluc*) and a protease inhibitor (*pin*) that are reliable defence markers in this plant system (Aziz *et al.*, 2003; Varnier *et al.*, 2009) were chosen for investigation. Transcript regulation of lipoxygenase (*lox*) was also monitored (Bézier *et al.*, 2002; Aziz

*et al.*, 2003) since LOX are involved in the synthesis of oxylipins, ROS regulation and play an important role in response to pathogen attack (Howe and Schillmiller, 2002). Expression profile of a new defence marker characterized through a differential display screen on *B. cinerea*/grapevine interaction (Bézier *et al.*, 2007), with unknown function and named *Vv17.3* was also investigated. In order to correlate defence gene expression to SA and JA signalling in our plant system, we first monitored the expression of the defence markers after treatment with exogenous SA and MeJA (Fig. 4). Interestingly, the *gluc* gene is specifically induced after MeJA treatment. Conversely, *Vv17.3* only responded to SA treatment. Both signal molecules stimulated *lox*, *chit4c* and *pin* expressions albeit inductions were higher after SA treatment. These results show that in our grapevine cell system, the *gluc* and *Vv17.3* genes are specific markers of the MeJA and SA signalling pathways, respectively.

We then monitored the expression profile of all genes 9 and 24 h after inoculation of grapevine cells with *B. phytofirmans* PsJN or *P. syringae* pv. *pisi*. All the defence markers were up-regulated after challenge with both bacteria (Fig. 5). *Gluc*, *lox* and *pin* expressions were significantly higher following *P. syringae* pv. *pisi* challenge at both time points (Figs. 5A and B). Surprisingly, although *P. syringae* pv. *pisi* also induced a stronger expression of *chit4c* at 24 h, *B. phytofirmans* was more efficient to stimulate this gene at 9 h. Up-regulation of *Vv17.3* was similar at 9h after inoculation with both bacteria but stronger in response to *P. syringae* pv. *pisi* at 24h.

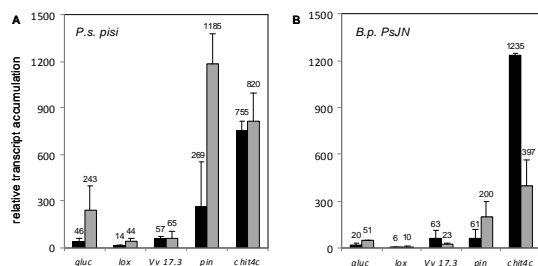


**Figure 4.** Defence gene expression in response to phytohormones. Transcript accumulation of genes encoding a glucanase (*gluc*), a lipoxygenase (*lox*), a chitinase (*chit4c*), *Vv17.3* and a protease inhibitor (*pin*) was monitored 24 h after treatment with water (control), methyl jasmonate (MeJA) or salicylic acid (SA). Analyses were performed by quantitative RT-PCR. Level of transcripts was calculated using the standard curve method from duplicate data, with grapevine *EF-1 $\alpha$*  gene as internal control. Results are expressed in relative transcript accumulation (fold increase) over the water control. Data presented are means of triplicate experiments  $\pm$  SD.

#### PGPR and non-host bacteria perception by grapevine cells results in production of SA

SA is a key molecule produced during non-host and incompatible interactions (Vlot *et al.*, 2009). The involvement of SA in plant/PGPR interactions is still under debate especially at



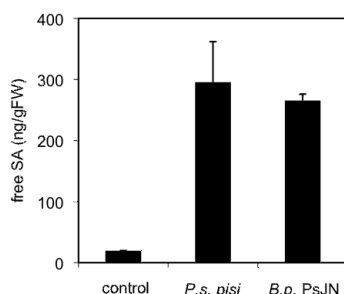


**Figure 5.** Defence gene expression in response to bacterial challenge. Transcript accumulation of genes encoding a glucanase (*gluc*), a lipoxygenase (*lox*), a chitinase (*chit4c*), *Vv17.3* and a protease inhibitor (*pin*) was monitored at 9 h (black bars) and 24 h (grey bars) after challenge with *P. syringae* pv. *pisi* (A) or *B. phytofirmans* PsJN (B). Analyses were performed by quantitative RT-PCR as described in Figure 4. Results are expressed in relative transcript accumulation (fold increase) over the  $MgCl_2$  control. Data presented are means of triplicate experiments  $\pm$  SD.

the local level (Ton *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2002; Pieterse *et al.*, 2009). Induction by *B. phytofirmans* PsJN of the specific SA dependant gene marker *Vv17.3*

## DISCUSSION

In a previous work, we showed that *B. phytofirmans* PsJN colonization of internal root tissues from grapevine vitro-plantlets resulted in the accumulation of phenolic compounds and the strengthening of cell walls in the exodermis, two traits of typical host defence responses (Compant *et al.*, 2005). Here, we present evidence that *B. phytofirmans* PsJN perception by grapevine cells triggers a local immune response including ion fluxes, SA production and defence gene activation. Although a larger number of studies has been focused on the extensive description of ISR (Gray and Smith, 2005; Van Wees *et al.*, 2008; Lugtenberg and Kamilova, 2009), only few studies have deciphered local responses, especially early signalling events induced by ePGPR in plants.



**Figure 6.** Free SA content analysis in grapevine cell suspensions challenged by *B. phytofirmans* PsJN and *P. syringae* pv. *pisi*. Free SA content was monitored in grapevine cells at 24 h after  $MgCl_2$  treatment (control) or after inoculation with *B. phytofirmans* PsJN (*B.p. PsJN*) and *P. syringae* pv. *pisi* (*P.s. pisi*). SA was extracted and analyzed by high-performance liquid chromatography. Data presented are means of duplicate experiments  $\pm$  SD.

These studies are mostly focused on bacteria from the *Pseudomonas* genus and *Arabidopsis thaliana*. Global transcriptome analysis of *A. thaliana* colonized by *Pseudomonas thivervalensis* revealed that only 9 genes were differentially expressed in root tissues that are in contact with the bacteria (Cartieaux *et al.*, 2003). Among these genes, only one was associated with stress response. Verhagen and co-workers also found that very few genes including transcription factors and genes related to ethylene regulation were differentially expressed in *Arabidopsis* roots challenged with *P. fluorescens* WCS417r (Verhagen *et al.*, 2004). By contrast, a clear induction of defence responses including phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxydase activities was observed in cucumber roots after treatment with *P. corrugata* and *P. aureofaciens* (Chen *et al.*, 2000). A recent work also demonstrated that phytoalexins including resveratrol and viniferin accumulated in grapevine cells challenged with three different strains of *P. fluorescens* and by *P. aeruginosa* (Verhagen *et al.*, 2010). These results and ours reinforce the hypothesis that the patterns of local defence responses strongly differ from plant to plant and are closely dependent on the ePGPR species or strains (van Loon *et al.*, 2008). Interestingly, only few studies described the early defence signalling events induced by ePGPR. Our results show that *B. phytofirmans* PsJN induced a transient extracellular alkalization but we did not detect any significant variation in  $H_2O_2$  levels. By contrast, *P. syringae* pv. *pisi* induced two-phased alkalisation and ROS responses. Recently, Verhagen *et al.* (2010) showed that grapevine cell suspensions challenged with *P. fluorescens* CH0 and *P. aeruginosa* 7NSK2 responded through a transient burst of  $H_2O_2$ . The  $H_2O_2$  level was dependent on the bacteria species. To our knowledge, this work is the sole with the present study to describe local early signalling responses to an ePGPR living organism.

Differences in the range and the scale of early defense events induced by some PGPR could be related to the nature of the eliciting compounds. Van Loon *et al.* (2008) tested lipopolysaccharides (LPS), flagellin and pyoverdine siderophores from *P. putida* and two *P. fluorescens* in tobacco cell suspensions. They found that early defence responses vary greatly depending on the nature and the origin of these Microbe-associated molecular patterns (MAMPs). Interestingly, flagellin from all strains triggered an alkalisation response, whereas only the flagellin from *P. putida* was inducing an oxidative burst. Addition to tobacco cell suspensions of surfactin lipopeptide, but not fengycin or iturin, induced defence-related early events such as extracellular medium alkalization and reactive oxygen species production (Jourdan *et al.*, 2009). Only few studies were aimed to characterize MAMPs from *Burkholderia* species. To our knowledge lipopolysaccharides (LPS) are the main MAMPs isolated from *B. cepacia* and *B.*





*plantarii*, which are active in tobacco and *Arabidopsis* (Gerber and Dubery, 2004; Gerber *et al.*, 2004, Zeidler *et al.* 2004). The majority of the eliciting activity from *B. phytofirmans* could be recovered using a boiled extract of the bacteria (H Lacroix, unpublished data). Interestingly, this crude extract was inducing an oxidative burst, suggesting that bacteria alive were probably regulating the levels of reactive oxygen species in the plant cell culture medium. Moreover, we did some experiments using proteinase K as described by Felix *et al.* (1999) and we found that the eliciting activity was mainly induced by a proteinous compound (H Lacroix, unpublished data). These results suggest that it is unlikely that LPS from *B. phytofirmans* play the major role as elicitor in our system.

The two-peak alkalisation and ROS profiles with *P. syringae* pv. *pisi* are characteristic of HR-inducing bacteria and have been described as a typical signature (XR) for non-host and incompatible interactions (Atkinson *et al.*, 1985; Baker and Orlandi, 1995; Glazener *et al.*, 1996). Interestingly, *P. syringae* pv. *pisi* responses in grapevine cells are comparable to those observed in tobacco cells suggesting similar mechanisms of perception and signalling (Atkinson *et al.*, 1985). By contrast, the alkalisation profile after challenge with *B. phytofirmans* PsJN is reminiscent to a compatible interaction profile (Glazener *et al.*, 1996) albeit no oxidative burst could be detected. Moreover, no disease symptoms but beneficial effects such as growth promoting and resistance to gray mold have been associated to grapevine colonization by this bacterium (Compant *et al.*, 2005). Thus, although some aspects of *B. phytofirmans* PsJN/grapevine interaction are reminiscent to a compatible interaction usually characterized by disease symptoms, there could be a switch leading to a mutualist behaviour of both organisms. In agreement with this, expression levels of defence genes in grapevine cells after *B. phytofirmans* PsJN perception are significantly weaker than those occurring after *P. syringae* pv. *pisi*. Moreover, no cell death could be detected after perception of the ePGPR. We can thus hypothesize that albeit plant cells probably recognize *B. phytofirmans* PsJN as a potential intruder, the low level of induced defences may explain the ability of the ePGPR to colonize the roots and to migrate into the entire plant including inflorescences (Compant *et al.*, 2005; Compant *et al.*, 2008b). By contrast, *P. syringae* pv. *pisi* strongly induced the complete battery of defence genes that we tested and caused cell death. This bacterium is also known to cause necrotic lesions and strong accumulation of PR proteins and phytoalexins when infiltrated in *Vitis vinifera* leaves (Robert *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 2002). Altogether, our results demonstrate that *B. phytofirmans* PsJN perception by grapevine cells triggers a local immune response. However, the defence responses are significantly weaker than those occurring in a non-host interaction.

Timing and differences in early signalling events after microorganism perception by plants govern later responses (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Early events are often followed by the production or mobilisation of signal molecules such as SA and JA, which are essential for the regulation of defence gene expression (Hammond-Kosack and Parker, 2003). The involvement of these two signal molecules after the recognition of ePGPR by plant cells is still matter of debate. Particularly, the involvement of SA in local defences induced by ePGPR is not fully documented and accepted (Van Wees *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2009). Here we showed that SA clearly accumulated in grapevine cells challenged with *B. phytofirmans* PsJN. In addition, we characterized a specific marker gene of the SA pathway in grapevine, named *Vv17.3*, which is clearly and reproducibly induced by *B. phytofirmans* PsJN in our system, strongly suggesting that SA is involved in the activation of defence responses in plant cells perceiving the bacteria. SA accumulation in ePGPR/plant interactions has only been described in few other studies. SA accumulation in tobacco plant in response to *P. fluorescens* 89B-61, *Bacillus pumilus* and *Serratia marescens* has been proposed to play a role in ISR (Zhang *et al.*, 2002). SA accumulates in bean leaves following *P. aeruginosa* 7NSK2 inoculation (De Meyer *et al.*, 1999). *P. fluorescens* strain Pf4 and *P. aeruginosa* strain Pag were also shown to induce the synthesis of SA in chickpea seedlings (Singh *et al.*, 2003). Recently, two different strains of *Streptomyces* and *Nocardioideis albus* EN46 were found to stimulate the expression of SA-dependant genes in *A. thaliana* (Conn *et al.*, 2008). Altogether these data and ours suggest that depending on the plant/bacteria interaction system, SA may be produced and play a role in defence responses induced by ePGPR. We also characterized a basic glucanase as a specific marker of the JA signalling. This gene is induced in response to *B. phytofirmans* PsJN, suggesting that in addition to SA, JA signalling is also involved in the induction of defence responses by the bacterium in grapevine.

Attachment of PGPR to plant cells is the very early step required in the plant-microbe interaction (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007). We found that *B. phytofirmans* PsJN was sticking to plant cells within the first hours of the interaction and that plant cells could be covered by bacteria in 24 h. Bacterial attachment in ePGPR-plant interaction has been well described for *Azospirillum brasilense*, *P. fluorescens*, *P. putida* and involves bacterial surface proteins, capsular polysaccharides, flagella, extracellular polysaccharides, pili depending on the interactions (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007). Attachment is also essential for the formation of biofilms. Some phytopathogenic bacteria also stick to host cells during plant tissue invasion. This contact is essential for the formation of T3SS and the translocation of effectors directly into plant cells (Buttner and Bonas, 2006). Interestingly, profile and kinetic of adhesion of *B. phytofirmans*



PsJN and *P. syringae* pv. *pisi* with plant cells are very similar. Mechanisms of attachment for both bacteria to grapevine cells are however not known and the incidence of this physical adhesion in the induction of defence responses remains to be investigated.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Fanja Rabenoelina for technical support, Alexandra Conreux and Patrice de Ruffray for SA analysis. This work was supported by Europôl' Agro.

#### REFERENCES

- Ait Barka E, Belarbi A, Hachet C, Nowak J, Audran JC. 2000. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 186, 91-95.
- Ait Barka E, Gognies S, Nowak J, Audran JC, Belarbi A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control* 24, 135-142.
- Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO Journal* 19, 2304-2314.
- Atkinson MM, Huang JS, Knopp JA. 1985. The hypersensitive reaction of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*: activation of a plasmalemma  $K^+/H^+$  exchange mechanism. *Plant Physiology* 79, 843-847.
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A. 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 1118-1128.
- Baker CJ, Orlandi EW. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33, 299-321.
- Bézier A, Lambert B, Baillieux F. 2002. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 108, 111-120.
- Bézier A, Mazeyrat-Gourbeyre F, Bonomelli A, Varnier AL, Paquis S, Hachet C, Manteau S, Dorey S, Dhondt-Cordelier S, Clément C, Baillieux F. 2007. Identification of grapevine genes regulated upon *Botrytis cinerea* infection by differential display. In: Jeandet P, Clément C, Conreux A, eds. *Macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine*: Intercept, 69-74.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 343-350.
- Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 379-406.
- Browse J. 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* 60, 183-205.
- Buttner D, Bonas U. 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology* 9, 193-200.
- Cartieaux F, Thibaud MC, Zimmerli L, Lessard P, Sarrobert C, David P, Gerbaud A, Robaglia C, Somerville S, Nussaume L. 2003. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal* 36, 177-188.
- Chen C, Bélanger R, Benhamou N, Paulitz TC. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 13-23.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1685-1693.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Ait Barka E. 2008a. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 607-626.
- Compant S, Kaplan H, Sessitsch A, Nowak J, Ait Barka E, Clément C. 2008b. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology* 63, 84-93.
- Conn VM, Walker AR, Franco CM. 2008. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 208-218.
- De Meyer G, Capieau K, Audenaert K, Buchala A, Metraux JP, Hofte M. 1999. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 450-458.
- Dorey S, Baillieux F, Pierrel M-A, Saindrenan P, Fritig B, Kauffmann S. 1997. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 646-655.
- Felix G, Regenass M, Boller T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant Journal* 4, 307-316.
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal* 18, 265-276.
- Frommel MI, Nowak J, Lazarovits G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown Potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology* 96, 928-936.
- Frommel MI, Nowak J, Lazarovits G. 1993. Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. *Plant and Soil* 150, 51-60.
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 711-724.
- Gerber IB and Dubery IA. 2004. Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry* 65, 2957-2966.
- Gerber IB, Zeidler D, Durner J and Dubery IA. 2004. Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta* 218, 647-657.



- Glazener JA, Orlandi EW, Baker CJ. 1996. The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiology* 110, 759-763.
- Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 395-412.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hammond-Kosack KE, Parker JE. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 177-193.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16, 463-471.
- Heath MC. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44, 321-334.
- Howe GA, Schillmiller AL. 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 230-236.
- Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Metraux JP. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 851-858.
- Jourdan E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthelemy JP, Thonart P and Ongena M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 456-468.
- Knoester M, Pieterse CM, Bol JF, van Loon LC. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 720-727.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63, 541-556.
- Monier JM, Lindow SE. 2004. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 346-355.
- Mur LA, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C. 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140, 249-262.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5, 308-316.
- Pillay VK, Nowak J. 1997. Inoculum density, temperature and genotype effects on the *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedling inoculated with a *Pseudomonad* bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 354-361.
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thévenot P, Boulay M, Buffard D, Esnault R. 2001. Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *ptisi*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *European Journal of Plant Pathology* 107, 249-261.
- Robert N, Roche K, Lebeau Y, Breda C, Boulay M, Esnault R, Buffard D. 2002. Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science* 162, 389-400.
- Rodriguez-Navarro DN, Dardanelli MS, Ruiz-Sainz JE. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters* 272, 127-136.
- Rosenblueth M, Martinez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 827-837.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, Wang-Pruski G, Nowak J. 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1187-1192.
- Sharma VK, Nowak J. 1998. Enhancement of *Verticillium* wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth-promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology* 44, 528-536.
- Singh UP, Sarma BK, Singh DP. 2003. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*). *Current Microbiology* 46, 131-140.
- Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CM. 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 27-34.
- Torres MA, Jones JD, Dangl JL. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141, 373-378.
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36, 453-483.
- van Loon LC, Bakker PA, van der Heijden WH, Wendehenne D, Pugin A. 2008. Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 1609-1621.
- Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 443-448.
- Varnier AL, Sanchez L, Vatsa P, Boudesocque L, Garcia-Brugger A, Rabenoelina F, Sorokin A, Renault JH, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieu F, Dorey S. 2009. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell & Environment* 32, 178-193.
- Verhagen BW, Trotel-Aziz P, Couderchet M, Hofte M, Aziz A. 2010. *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 61, 249-260.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 895-908.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47, 177-206.
- Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis*



*thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15811-15816.

Zhang S, Moyne AL, Reddy MS, Kloepper JW. 2002. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 25, 288-296.





Les études menées sur l'interaction entre la vigne et la bactérie bénéfique *B. phytofirmans* souche PsJN ont démontré que, suite à l'inoculation des racines, cette bactérie est capable d'établir des populations rhizo et endophytiques avec la plante (Compant *et al.*, 2005b & 2008). Cependant, les modifications physiologiques que la bactérie peut engendrer localement lors de cette interaction ont été peu étudiées, en particulier celles liées aux réactions de défense.

Dans cette étude (Chapitre1-Publication1), nous nous sommes intéressés aux réponses immunitaires induites suite à la mise en contact de suspensions cellulaires avec la bactérie. Les observations microscopiques ont révélé que la souche PsJN et les cellules interagissent physiquement et très rapidement (dès les premières minutes) après leur mise en contact. Cette interaction engendre une alcalinisation du milieu extracellulaire (événement précoce). Cependant, ni la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ni la mort cellulaire n'ont été observées. En revanche, Verhagen *et al.* (2010) avaient observé une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les cellules de vigne mises en présence de *Pseudomonas* spp (souches PGPR). L'originalité de ce travail était également de comparer ces réactions avec celles engendrées par un micro-organisme non-hôte. Au laboratoire, nous disposons de la bactérie *P. syringae* pv *pisi* (Robert *et al.*, 2001 & 2002). Les résultats observés lors de l'interaction avec la souche PsJN (PGPR) diffèrent de ceux ayant lieu lors de l'interaction entre les cellules de vigne et *P. syringae* pv *pisi*. En effet, dans ce cas, la perception de l'agent non-hôte provoque une alcalinisation du milieu en 2 phases, un burst oxydatif (en 2 phases), ainsi qu'une mort cellulaire, ces événements étant caractéristiques d'une réaction d'hypersensibilité. Les événements précoces mis en place par les cellules interagissant avec la souche PsJN sont donc 'minimisés' comparés à ceux mis en place lors de l'interaction avec la bactérie non-hôte.

Par la suite, nous avons étudié et comparé l'expression de gènes de défense (*pin*, *gluc*, *chit4c*, *VvI7.3* et *Lox*) suite à l'interaction avec la souche PsJN ou la bactérie non-hôte. Les résultats obtenus montrent que l'expression de tous les gènes testés est induite dans les cellules au contact des 2 bactéries, mais que les niveaux d'induction sont plus forts lors du contact avec *P. syringae* pv *pisi*. Nous avons également démontré que *B. phytofirmans* souche PsJN est capable d'induire simultanément les voies de signalisation dépendantes de l'AS et l'AJ chez la vigne, ainsi qu'une production d'AS par les cellules. Les PGPRs sont connues pour activer la voie de signalisation dépendante de l'AJ/ET (van Loon *et al.*, 2006b), mais certaines peuvent stimuler la voie dépendante de l'AS (De Meyer *et al.*, 1999 ; Tjamos *et al.*, 2005 ;



Domenech *et al.*, 2007 ; Rudrappa *et al.*, 2008) ou ces 2 voies simultanément (Zhang *et al.*, 2002 ; Conn *et al.*, 2008).

La souche PsJN n'induit pas de réponse de type RH contrairement aux agents pathogènes. Cependant, l'accumulation de composés phénoliques, mise également en évidence dans le cas d'agents pathogènes ou d'éliciteurs, peut se mettre en place suite à l'inoculation de la plante par cette PGPR. En effet, Compant *et al.* (2005b) ont observé un renforcement des parois racinaires suite à l'inoculation des racines de vitroplants par la souche PsJN. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur le modèle bouture, qui est le modèle d'étude se rapprochant le plus de la vigne en condition naturelle (vignoble). Ainsi, nous avons étudié par microscopie la production de FAOs ( $H_2O_2$  et NO) ainsi que l'accumulation de composés phénoliques dans des racines de boutures à la suite de l'inoculation des racines par la souche PsJN.



## **Publication 2**

### **Phenolic compound accumulation and ROS production in roots of *Vitis vinifera* L. colonized by the endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN**

Sophie Bordiec<sup>1\*</sup>, Stéphane Compant<sup>2\*</sup>, Christophe Clément<sup>1</sup>, Sandrine Dhondt<sup>1</sup> and Essaïd Ait<sup>1</sup>  
Barka

<sup>1</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire Stress, Défense et Reproduction des  
Plantes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

<sup>2</sup>Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, av Agrobiopôle, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan cedex,  
France

\*co-1<sup>er</sup> auteur

Résultats complémentaires



## Phenolic compound accumulation and ROS production in roots of *Vitis vinifera* L. colonized by the endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN (résultats complémentaires)

Sophie Bordiec<sup>1\*</sup>, Stéphane Compant<sup>2\*</sup>, Christophe Clément<sup>1</sup>, Sandrine Dhondt<sup>1</sup> and Essaid Ait Barka<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire Stress, Défense et Reproduction des Plantes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

<sup>2</sup>Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, av Agrobiopôle, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan cedex, France

\*These authors contribute equally to this work

\*\*Corresponding author: ea.barka@univ-reims.fr

### ABSTRACT

*Burkholderia phytofirmans* strain PsJN, an endophytic plant growth-promoting bacterium (PGPR), stimulates plant growth and protects plants, including grapevine, against various forms of stresses. However, the local immunity following grapevine inoculation by strain PsJN still remains unknown. Cuttings of *Vitis vinifera* L. cv. 'Chardonnay' were thus root inoculated with strain PsJN and some defense mechanisms were monitored in roots. Our

results showed that following its epiphytic and/or endophytic colonization, strain PsJN induced local defense reactions such as phenolic deposition as well as oxidative and nitric bursts at the root level. Strain PsJN seemed to be first recognized by grapevine as an invader, and then as a beneficial partner, the defense compound accumulations being of slight intensity and without damage symptoms.

**KEYWORDS:** *Burkholderia phytofirmans*, PGPR, grapevine, local defense responses, ROS, phenolic compounds

### INTRODUCTION

In both natural and managed environments, association between plants and beneficial microorganisms (plant growth-promoting microorganisms, PGPMs) can have a profound effect on plant growth, yield and soil quality (Compant *et al.*, 2005a; Avis *et al.*, 2008). PGPRs (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) are bacterial PGPMs living in plant rhizosphere, the rich nutrient zone near (few mm) the roots, where microbial growth is stimulated by root exudates (Haas and Défago, 2005). Following root colonization, PGPRs can also trigger the induced systemic resistance (ISR) that protects plants against a broad spectrum of pathogens (van Loon, 2007; Yang *et al.*, 2009; De Vleeschauwer and Höfte, 2009). Even though ISR increase level of resistance, defense mechanisms are generally not activated in plants upon perception of PGPRs. Rather, tissues are sensitized to respond faster and/or stronger when plants are submitted to pathogen attacks, a phenomenon known as priming (Conrath, 2009). This differs from the well known systemic acquired resistance (SAR) induced in plants by pathogenic microorganisms.

Perception of pathogens by plants induces local defense responses that participate to the induction of signalling pathways leading to SAR establishment. Early stages of such interaction are characterized by ion fluxes, MAP kinase cascade activation and the production of reactive oxygen species (ROS; Yang *et al.*, 1997; Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006; Pitzschke *et al.*,

2009). ROS, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nitric oxide (NO), are induced a few hours after stress perception and can act as secondary messengers inducing some defence responses (hypersensitive response, modification of gene expressions, cell wall strengthening) or act directly towards pathogens (Neill *et al.*, 2002; Delledonne, 2005; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Recent studies have reported that some PGPRs or their MAMPs (Microbial-Associated Molecular Patterns) also induce early signalling events such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide (NO), PR (pathogenesis-related) gene expression as well as others defense responses such as strengthening of cell walls and phytoalexins accumulation (van Loon, 2007; Jourdan *et al.*, 2008; van Loon *et al.*, 2008; Verhagen *et al.*, 2010; Bordiec *et al.*, in press).

Some PGPRs may be endophytic, since they penetrate inside root tissue (Hardoim *et al.*, 2008; Compant *et al.*, 2010), and sometimes diffuse through vessels to others organs (Gyaneshwar *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2005; Compant *et al.*, 2008). Numerous endophytic bacteria were isolated last years (Lodewyckx *et al.*, 2002; Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006). One of these is *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN (Sessitsch *et al.*, 2005), a PGPR isolated from onion roots (Frommel *et al.*, 1991) that can create intimate associations with various plant hosts and contribute to increase their growth and development (Nowak and Shulaev, 2003). In grapevine, we recently described that this bacterium can form epi- and endophytic subpopulations (Compant *et al.*, 2005b, 2008) and protect the plant against *Botrytis cinerea*, the causal





agent of grey mold (Ait Barka *et al.*, 2000, 2002). Recently, Bordiec *et al.* (in press) characterized local defense events (alkalinization, gene expression) appearing during grapevine cells-*B. phytofirmans* strain PsJN interaction. This bacterium can also induce cell-wall strengthening during root internal tissues colonization mainly through polyphenolic compounds accumulation as demonstrated using *in vitro* based system (Compant *et al.*, 2005b). However, under *in vivo* conditions, local events following root colonization by strain PsJN are still not determined. In this purpose, we analysed some early plant defense reactions following root inoculation of fruiting cuttings with strain PsJN at the local level (in roots) such as nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production, as well as phenolic compound accumulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and growth conditions

Three-node cuttings (20 cm long) of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay were cane pruned from 6-year-old plants from Moët et Chandon vineyard (Epernay, France). Fruiting cuttings were then prepared according to Compant *et al.* (2008). Before use and after 15 h of cryptonol (0.05%) hydration at 28°C, fruiting cuttings were surface sterilized during 30 min in an ethanol bath (70°), then placed in a bleach solution (2.5%) during 10 min before to rinse them three times in sterilized tap water baths. The two proximal nodes were removed and cuttings were immersed for 30 s in indole-3-butyric acid (2 g/L) to promote rhizogenesis and then stored in containers with sterilized tap water until roots were developed. Plants were incubated in a growth chamber at 25/20°C day/night temperature, 16 h photoperiod, under 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (Lumilux cool white L30W/840 and Fluora L30W/77, Osram, Germany) and 70% relative humidity. To facilitate development of inflorescence, leaves were removed daily as described by Lebon *et al.* (2005). When roots were sufficiently developed, cuttings were placed in plastic pots (9x9x10 cm) filled with sterilized 1/5 (v/v)

clay balls and 4/5 (v/v) potting soil, irrigated daily with sterilized tap water and incubated as described before.

### Inoculum preparation

*Burkholderia phytofirmans* strain PsJN tagged *gfp* or wild type strain were grown in 100 ml Luria-Bertani liquid medium in 250 ml Erlenmeyer flask and incubated at 25°C, on a shaker (150 rpm) for 48 h. Bacteria were collected by centrifugation (4500 g; 10 min) and washed twice with sterile phosphate buffer saline (PBS; pH 6.5, 10 mM). The bacterial concentration of the inoculum was then adjusted with PBS, based on optical density at 600 nm (Pillay and Nowak, 1997).

### Plant inoculation

Soils of fruiting cuttings with fully developed inflorescences, corresponding to stage 57 (preflowers buds) according to the BBCH scale (Meier, 2001), were inoculated with bacterial inoculum in order to have  $5.10^7$  CFU per g of soil.

### Autofluorescence detection of phenolic compounds

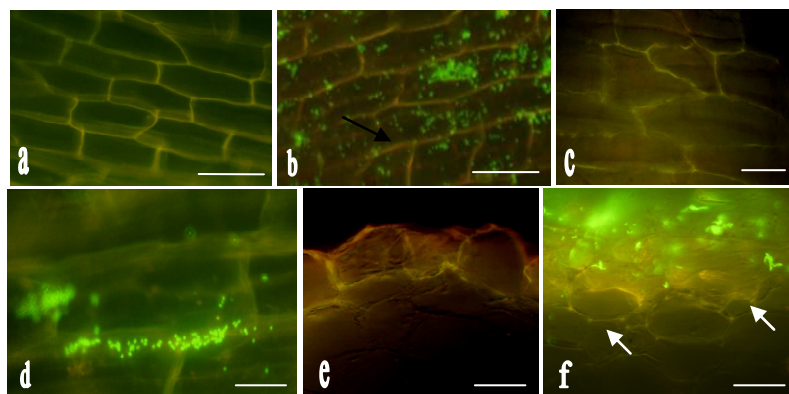
Autofluorescent phenolic compounds were detected according to Compant *et al.* (2005b). Briefly, roots were placed on glass slide 12 and 96 hpi (hours post inoculation) and examined under epifluorescence microscope at 495 nm.

### Cytological detection of hydrogen peroxide

For histochemical detection of hydrogen peroxide, the 3,3-benzidine-HCl (DAB, Sigma-Aldrich) method was used according to Thordal-Christensen *et al.* (1997). Entire roots were immersed 12 and 96 hpi in the DAB solution (1 mg/mL for 8 h at 37°C) before being observed under optical microscope.

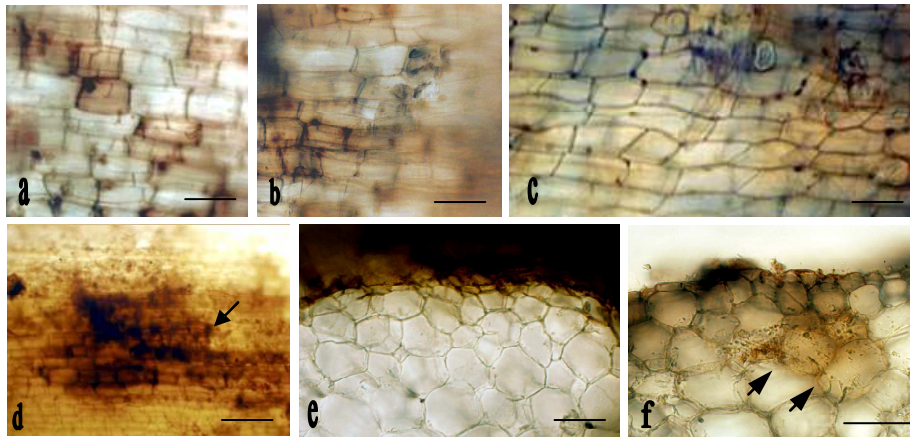
### Nitric oxide detection

Nitric oxide localisation was determined by using the 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA, Sigma-Aldrich) fluorophore according to Desikan *et al.* (2002) with some modifications. Entire



**Fig 1:** Microphotographs of autofluorescent phenolic compounds on the root surface (a-d) and inside root internal tissues (e and f) after 12 (a and b), and 96 (c-f) hpi with control (a, c and e) or strain PsJN tagged *gfp* (b, d and f), showing no differences on the root surfaces but a more pronounced accumulation of autofluorescent phenols in exodermis and in the first cell layers of bacterized roots (arrows). PsJN tagged *gfp* was used to visualize bacterial cells on and inside the root system. Scale bars: (a-b) 50  $\mu\text{m}$ , (c) 20  $\mu\text{m}$ , (d) 15  $\mu\text{m}$ , and (e and f) 50  $\mu\text{m}$ .





**Fig 2:** Microphotographs of  $H_2O_2$  accumulation, using DAB staining method, on the root surface (a-d) and inside root internal tissues (e and f) after 12 (a and b) and 96 (c-f) hpi with control (a, c and e) or PsJN wild type strain (b, d, and f) showing no difference in  $H_2O_2$  accumulation 12 hpi but a slight more accumulation of  $H_2O_2$  96 hpi in bacterized roots, as detected on the root surface (arrows) as well as inside root internal tissues (arrow heads). Scale bars: (a) 50  $\mu m$ , (b and c) 100  $\mu m$ , (d) 200 $\mu m$ , (e and f) 100  $\mu m$ .

roots were immersed 12 and 96 hpi in a DAF-2DA solution at 10  $\mu M$  in a KCl buffer for 10 min, followed by a wash step (in a KCl buffer) for 20 min before that samples were examined under epifluorescence microscope at 495 nm.

## RESULTS

### Accumulation of autofluorescent phenolics

Autofluorescent phenolics have been detected on the root surface of both control and bacterized plants 12 and 96 hpi with no significant differences between the two treatments (Fig 1a-d). A noticeable difference occurred, however, in root internal tissues 96 hpi. Bacterized plants accumulated thus more phenolic compounds in exodermis and in the first layers of the cortex than non-bacterized plants (Fig 1e-f).

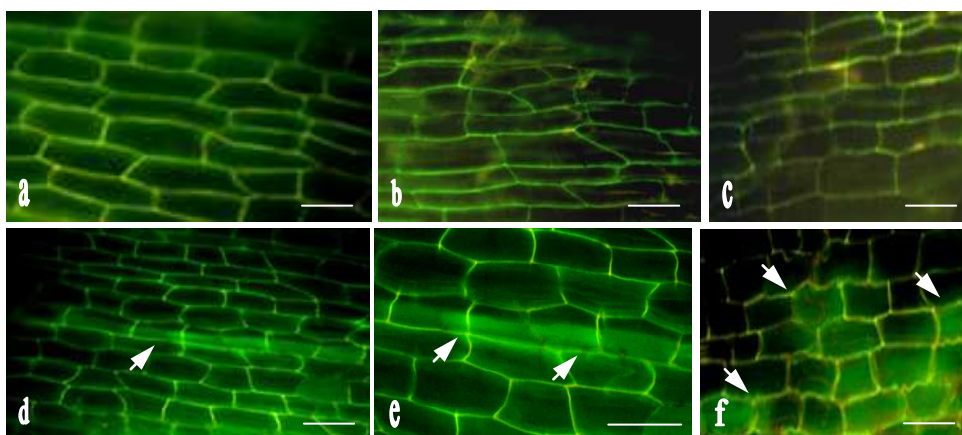
### Hydrogen peroxide production

$H_2O_2$  production progressively increased from the basal part of the

root tips independently of the time after inoculation, as demonstrated by a red/pink colour in both control and bacterized plants by using the DAB method (Fig 2). No difference was found on the root surfaces between the two conditions 12 hpi (Fig 2a and 2b). However, a slight difference occurred between the bacterized and control treatments 96 hpi.  $H_2O_2$  accumulation was thus found more pronounced on the root surfaces (Fig 2c and 2d) and inside root internal tissues colonized by strain PsJN (Fig 2e and 2f).

### Nitric oxide production

Similarly to  $H_2O_2$ , NO accumulated in roots of control plants as demonstrated using DAF-2DA fluorescent probe (Fig 3). NO production was thus detected on the root surface of control plants as visualized on the cell-wall of rhizodermal cells and increased from the proximal parts of the root to the tips. On the root surfaces of bacterized plants, NO accumulation was comparable to that found in the control treatment 12 hpi (Fig 3a and 3b).



**Fig 3:** Microphotographs of nitric oxide accumulation on the root surface after 12 (a and b), and 96 (c-f) hpi with control (a and c) or PsJN wild type strain (b, d, e and f) showing no difference 12 hpi but a slight more accumulation (arrow heads) of NO at subcellular level of some rhizodermal cells in bacterized roots 96 hpi (d-f) using DAF-2DA fluorescent probe. Scale bars: (a-c) 50  $\mu m$ , (c) 75  $\mu m$ , (e and f) 50  $\mu m$ .



However, the two treatments showed slight differences 96 hpi. DAF-2DA/NO associated fluorescence was thus visualized at the subcellular level of roots colonized by strain PsJN in comparison to the control treatment in which no such accumulation was observed (Fig 3c-f)

## DISCUSSION

This study clearly demonstrates that *B. phytofirmans* strain PsJN triggered grapevine defense responses in roots. These plant responses involved firstly early events such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO accumulations. These ROS were detected both on the root surfaces of control and bacterized plants independently of time after inoculation. This is in accordance with previous studies showing that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO are usually produced during root elongation and plant development (Torres and Dangl, 2005; Stöhr and Strelau, 2006). At an early stage, bacterized and control plants did not behave differently in terms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO productions, but differences were detected 96 hpi. Interestingly, more pronounced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO productions were visualized on and/or inside root tissues of bacterized roots in comparison to control plants, demonstrating that these events are triggered in grapevine plants by strain PsJN. Nevertheless, no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was observed in grapevine cell suspensions challenged with strain PsJN (Bordiec *et al.*, in press). Rhizoplane colonization may be required for inducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO productions. However, it has been reported that these so-called early events are induced during few hours following inoculation (Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Mur *et al.*, 2006). As we detected them on and/or inside root internal tissues 96 hpi and as strain PsJN can penetrate inside roots within the first 2-3 days post inoculation (Compant *et al.*, 2008), the hypothesis that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO productions could be correlated to the bacterial penetration inside root internal tissues can not be excluded. According to this, strain PsJN may secrete various cell wall degrading enzymes that allow penetration inside roots (Compant *et al.*, 2005b). These enzymes can be potential MAMPs and/or trigger damage-associated molecular pattern (DAMP) formation in the plant, both being able to induce plant defense responses including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO accumulations (Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Lyon, 2007; De Vleeschauwer and Höfte, 2009). Bordiec *et al.* (in press) showed that the major MAMP of strain PsJN seemed unlikely to be LPS but rather a proteinous compound. As H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO are produced when a pathogen infects and invades plant tissues or by its MAMPs (Torres *et al.*, 2006; Lyon, 2007; Hong *et al.*, 2008), strain PsJN seems to be first recognized as an invader by grapevine, and then as a beneficial partner, as previously described by Bordiec *et al.* (in press).

During grapevine-strain PsJN interaction, autofluorescent phenolic compounds are produced. However, strain PsJN did not induce phenolic accumulation on the root surface, but these compounds were detected inside grapevine roots, mainly in the exodermis and

in the first cell layers of cortical cells. This suggests that the production of phenolic compounds is also linked to the endophytic colonization of roots by strain PsJN and is in accordance to previous study under gnotobiotic conditions (Compant *et al.*, 2005b). The accumulation of autofluorescent phenolic compounds has been often linked to hypersensitive response (HR; Heath, 2000). However, PGPR generally do not induce HR as they do not trigger strong plant defense reactions (van Loon and Bakker, 2005; Bordiec *et al.*, in press). Rather, only a slight polyphenolic compound accumulation is induced during plant-PGPR interaction. This has been often described during various plant-endophytic PGPR interactions, which is not surprising as endophytic PGPR create little stress when they enter inside plant tissues without being harmful for their hosts (Hallmann, 2001; Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006; Hardoim *et al.*, 2008).

Our results are strongly similar to phenomena induced by symbiotic PGPR as it was demonstrated that they can trigger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO on the root surface and inside plant internal tissues (Santos *et al.*, 2001; Baudoin *et al.*, 2006), suggesting that these early events are also plant responses following PGPR inoculation. The present study clearly demonstrates that strain PsJN induced grapevine plant defense responses in roots following inoculation. However, the way by which strain PsJN evades plant defense mechanisms to behave as a beneficial bacterium remains to be investigated. This could be a switch leading to the beneficial properties conferred to grapevine by strain PsJN.

## REFERENCES

- Ait Barka E., Gognies S., Nowak J., Audran J-C. and Belarbi A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, **24**, 135-142.
- Ait Barka E., Belarbi A., Hachet C., Nowak J. and Audran J-C. (2000). Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mold of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **186**, 91-95.
- Avis T.J., Gravel V., Antoun H. and Tweddell R.J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 1733-1740.
- Baudouin E., Pieuchot L., Engler G., Pauly N. and Puppo A. (2006). Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 970-975.
- Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., Ait Barka E., Kauffmann S., Jeandet P., Clément C., Baillieul F. and Dorey S. (in press). Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* in grapevine cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/erq291.
- Chi F., Shen S-H., Cheng H-P., Jing Y-X., Yanni Y.G. and Dazzo F.B. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7271-7278.



- Compant S., Clément C. and Sessitsch A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 669-678.
- Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowak J., Ait Barka E. and Clément C. (2008). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology and Ecology*, **63**, 84-93.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2005a). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4951-4959.
- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2005b). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1685-1693.
- Conrath U. (2009). Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, **51**, 361-395.
- Delledonne M. (2005). NO is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 390-396.
- Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, **99**, 16314-16318.
- De Vleeschauwer D. and Höfte M. (2009). Rhizobacteria-Induced systemic Resistance. *Advances in Botanical Research*, **51**, 223-281.
- Frommel M.I., Nowak J. and Lazarovits G. (1991). Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*, **96**, 928-936.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D. and Pugin A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 711-724.
- Garcion C., Lamotte O. and Métraux J.P. (2007). Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Balckwell publishing, pp 109-132.
- Gyaneshwar P., James E.K., Mathan N., Reddy P.M., Reinhold-Hurek B. and Ladha J. (2001). Endophytic colonisation of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 2634-2645.
- Haas D. and Defago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 307-319.
- Hallmann J. (2001). Plant interactions with endophytic bacteria. In Biotic interactions in plant-pathogen associations, Jeger M.J. and Spence N.J. (eds), CABI, Wallingford, UK, pp87-119.
- Hardoim P.R., van Overbeek L.S. and van Elsas J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, **6**, 463-471.
- Heath M.C. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 315-319.
- Hong J.K., Yu B-W., Kang J-G., Raja M.U., Kwon E., Sorhagen K., Chu C., Wang Y. and Loake G.J. (2008). Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 147-154.
- Jourdan E., Ongena M. and Thonart P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **12**, 437-449.
- Lebon G., Duchêne E., Brun O. and Clément C. (2005). Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Annals of Botany*, **95**, 943-948.
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. and van der Lelie D. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**, 583-606.
- Lyon G. (2007). Agents that can elicit induced resistance. In: Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Balckwell publishing, pp 9-29.
- Meier U. (2001). Grapevine. In: Growth stage of mono- and dicotyledonous plants, BBCH monograph. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (ed.), Berlin, Germany, pp91-93.
- Mur L.A., Carver T.L. and Prats E. (2006). NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 489-505.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. and Hancock J.T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1237-1247.
- Novak J. and Shulaev V. (2003). Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plantarum*, **39**, 107-124.
- Pillay V.K. and Nowak J. (1997). Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 354-361.
- Pitzschke A., Schikora A. and Heribert H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 421-426.
- Rosenblueth M. and Martinez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 827-837.
- Santos R., Hérouart D., Sigaud S., Touati D. and Puppo A. (2001). Oxidative burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 86-89.
- Sessitsch A., Coenye T., Sturz A.V., Vandamme P., Ait Barka E., Salles J.F., Van Elsas J.D., Faure D., Reiter B., Glick B.R., Wang-Pruski G. and Nowak J. (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1187-1192.
- Stöhr C. and Stremlau S. (2006). Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 463-470.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y. and Collinge D.B. (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, **11**, 1187-1194.
- Torres M.A., Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006). Reactive oxygen species signalling in response to pathogens. *Plant Physiology*, **141**, 373-378.





Torres M.A. and Dangl J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 397-403.

van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., van der Heijdt W.H.W., Wendehenne D. and Pugin A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1609-1621.

van Loon L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, **119**, 243-254.

van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M. (2005). Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Siddiqui Z.A (ed.), Springer, Dordrecht, pp39-66.

Verhagen B.W.M., Trotel-Aziz P., Couderchet M., Höfte M. and Aziz A. (2010). *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 249-260.

Yang J., Kloepper J.W. and Ryu C-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, **14**, 1-4.

Yang Y., Shah J. and Klessig D.F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development*, **11**, 1621-1639.



Dans cette étude complémentaire (Chapitre1-Publication2), nous avons démontré que la colonisation épi- et/ou endophytique des racines induit une accumulation de composés phénoliques permettant le renforcement des parois, ainsi qu'une production d' $H_2O_2$  et de NO. Il semblerait donc que le modèle d'étude (bouture ou cellule) influe sur la production d' $H_2O_2$ , dans la mesure où nous n'avons pas observé de burst oxydatif sur les cellules (Chapitre1-Publication1). La production tardive de FAOs et de composés phénoliques a été associée à la pénétration de la bactérie dans les racines. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque les PGPRs endophytes peuvent induire un léger stress lors de la pénétration à l'intérieur de la plante, notamment par la sécrétion d'enzymes telles que des cellulases, des endoglucanases, des polygalacturonases et des xylases (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006 ; Hardoim *et al.*, 2008). Ces enzymes peuvent donc provoquer la formation de DAMPs et/ou être reconnues en tant que MAMPs. Dans les 2 cas, les DAMPs et les MAMPs induisent des mécanismes de défense comme par exemple la production de FAOs (Garcia-Brugger *et al.*, 2006 ; Lyon, 2007). Quelques données supplémentaires sont manquantes afin de publier ces résultats, comme par exemple un dosage des concentrations locales d' $H_2O_2$  et de NO.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont donc permis de caractériser la perception de *B. phytofirmans* souche PsJN par la vigne. Cette perception engendre localement une réponse immunitaire *in vitro* et *in vivo*, mais sans provoquer de dommages à la plante. Ces travaux renforcent donc l'idée que les réponses de défense mise en place par la plante diffèrent selon l'interaction plante/PGPR. Généralement, les PGPRs n'induisent pas de réponse immunitaire chez leur hôte lors de leur perception, mais sensibilisent plutôt la plante (potentialisation) afin qu'elle puisse mieux se défendre lors d'un stress ultérieur (Conrath, 2009). Ait Barka *et al.* (2000, 2002 & 2006) ont démontré que la souche PsJN confère à la vigne (vitroplants entièrement colonisés) une protection contre le froid et *B. cinerea*. Dans les chapitres suivants, nous avons caractérisé cette interaction afin de déterminer si ces protections peuvent être associées à la potentialisation de mécanismes de défense.



## Chapitre 2

Caractérisation de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN lorsque la plante est exposée au froid



### **Publication 3**

## **Priming *Vitis vinifera* L. with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is correlated to better acclimation to low non-freezing temperatures**

Andreas Theocharis<sup>(1)</sup>, Sophie Bordiec<sup>(1)</sup>, Olivier Fernandez, Sandra Paquis, Sandrine Dhondt-Cordelier, Fabienne Baillieul, Essaïd Ait Barka and Christophe Clément

Université de Reims Champagne-Ardenne, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne (EA 2069),  
Laboratoire de Stress, Défense et Reproduction des Plantes, UFR Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039,  
51687 Reims Cedex 2, France.

<sup>(1)</sup> co-1<sup>er</sup> auteur

soumise à *Physiologia Plantarum*





**Priming *Vitis vinifera* L. with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is correlated to better acclimation to low non-freezing temperatures (soumise à *Physiologia Plantarum*)**

Andreas Theocharis<sup>(1)</sup>, Sophie Bordiec<sup>(1)</sup>, Olivier Fernandez, Sandra Paquis, Sandrine Dhondt-Cordelier, Fabienne Baillieul, Essaïd Ait Barka and Christophe Clément\*

Université de Reims Champagne-Ardenne, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne (EA 2069), Laboratoire de Stress, Défense et Reproduction des Plantes, UFR Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

(1) these authors contributed equally to the work.

\* **corresponding author:** Pr Christophe Clément (christophe.clement@univ-reims.fr), Tel/fax: + 33 3 26 91 34 41

### Abstract

*Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is a plant growth-promoting rhizobacterium that colonizes grapevine tissues and induces resistance to grey mould and low non-freezing temperatures. To check whether this beneficial effect is mediated by a priming effect, stress-related gene expression and metabolite accumulation were monitored in six week-old bacterized and non-bacterized grapevine plantlets submitted to low non-freezing temperatures. When plantlets were grown at 26°C, bacterization had no significant effect on tested

parameters. By contrast at 4°C, both stress-related gene transcripts and metabolite levels increased in a higher extent in bacterized plantlets than in non-bacterized ones. These results indicate that the protective effect of the *B. phytofirmans* strain PsJN against cold stress is correlated to the phenomenon of priming. Moreover, one week after cold exposure, stress-related metabolite accumulation decreased faster in bacterized than in non-bacterized plantlets, suggesting that the presence of the bacteria in plant tissues favours the cold acclimation process *via* scavenging system.

**Abbreviations:** AFP, anti-freezing proteins; BABA,  $\beta$ -aminobutyric acid; CBF, C-repeat binding factor; Chit, chitinase; COR, cold regulated; Gluc, glucanase; ISR, induced systemic resistance; JA, jasmonic acid; KIN, cold induced; LOX, lipoxygenase; LTI, low temperature induced; MDA, malondialdehyde; PAL, phenyl ammonia lyase; PGPR, plant growth promoting rhizobacterium; PR, pathogenesis related; ROS, reactive oxygen species; StSy, stilbene synthase; TCA, trichloroacetic acid.

### Introduction

During the course of evolution, plant species have developed mechanisms that enable them to acclimate to coldness by minimizing cold stress deleterious effects (Gilmour et al. 2000, Xin and Browse 2000). Under low non freezing temperatures, cell membranes of cold sensitive plants rigidify, leading to a disturbance of membrane-related processes such as opening of ion channels or membrane-associated electron transfer reactions (Alonso et al. 1997, Uemura and Steponkus 1999). As a consequence, the whole plant physiology is affected as revealed by the decrease of photosynthesis and subsequent growth alteration (Ait Barka et al. 2006). By contrast, cold-tolerant plants may adapt to these adverse conditions and thus maintain their optimal physiological activity.

Numbers of physiological changes have been identified related to cold acclimation (Thomashow 1999, Chinnusamy et al. 2006, Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki 2006), including general stress-related responses such as reactive oxygen species (ROS)

accumulation (Neill et al. 2002), but also cold specific traits. Cold acclimation has been shown to be correlated to (i) accumulation of cryoprotective compounds such as sugars and proline (Hekneby et al. 2006, Patton et al. 2007), (ii) regulation of specific gene expression (Hughes and Dunn 1996, Chinnusamy et al. 2006) and (iii) synthesis of cold-stress related proteins (Hughes and Dunn 1996, Thomashow 1999). In this way, the analysis of cold acclimation phenomenon reveals a complex process resulting in a coordinated up- or down-regulation of hundreds genes. For example, transcript levels of cold regulated (COR), low-temperature induced (LTI) or cold induced (KIN) genes greatly increased within few hours following cold exposure (Thomashow 1999). The signal transduction pathways leading to expression of cold-regulated genes in *Arabidopsis thaliana* involve a regulatory network in which C-repeat binding factor (CBF) transcription factors (*CBF1-3*) control many COR genes during cold acclimation (Fowler and Thomashow 2002, Xiao et al. 2006, Tattersall et al. 2007, Xiao et al. 2008).



In grapevine, low temperatures decrease both growth and photosynthesis (Flexas et al. 1999, Hendrickson et al. 2003, Hendrickson et al. 2004, Bertamini et al. 2005, Ait Barka et al. 2006) but stimulate both carbohydrate metabolism (Hamman et al. 1996) and proline accumulation (Ait Barka and Audran 1997, Ait Barka et al. 2006). Recently, a *Vitis vinifera* *CBF4* gene, homologue to *A. thaliana* *CBF1*, has been characterized upon exposure to low non-freezing temperature (4°C) and might be preponderant for the over-wintering of grape plants (Xiao et al. 2008).

*Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) able to establish rhizospheric and endophytic populations in various plants (Nowak and Shulaev 2003). This bacterium stimulates plant growth and induces physiological changes leading to a better plant adaptation to environmental stresses (Nowak et al. 1995, Pillay and Nowak 1997, Bensalim et al. 1998, Sharma and Nowak 1998). In grapevine, it was recently established that *B. phytofirmans* strain PsJN colonizes the rhizosphere, penetrates roots and thus diffuses through all plant tissues (Compant et al. 2005). Furthermore, the presence of the bacterium in the plant causes a better acclimation to chilling (*ie* non-freezing) temperatures, as revealed by (i) lower cell damages, (ii) higher photosynthetic activity and (iii) accumulation of cold stress related metabolites such as starch, proline and phenolic compounds (Ait Barka et al. 2006).

Following colonization of roots by beneficial microbes, infection by necrotizing pathogens, or after treatment with various chemicals, plants can establish a unique physiological situation so called “primed” state (Conrath 2009). Primed plants respond by activating defense responses faster and/or stronger when subsequently challenged by microbial pathogens, herbivorous insects, or abiotic stresses (Conrath et al. 2002, Conrath et al. 2007, Goellner and Conrath 2008, Conrath 2009).

The beneficial interaction between grapevine and *B. phytofirmans* strain PsJN remains to be further elucidated, especially how the presence of this strain helps to withstand cold. We hypothesized that bacterized plants might be primed to respond quicker or more efficiently to cold conditions. In this purpose, we analyzed the ability of the bacterium to potentiate (i) expression of defense- and cold-related genes and (ii) changes in concentrations of several stress-related metabolites such as proline, stress-related aldehydes and hydrogen peroxide.

## Materials and Methods

### Plant material and *in vitro* growth conditions

Plantlets of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay clone 7535 were micro-propagated by nodal explants grown on 15 ml agar medium in 25 mm culture tubes as described earlier (Ait Barka et al. 2006). Cultures were performed in a growth chamber under

white fluorescent light (200  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) with 16 h light per day at constant 26°C.

### Bacterial inoculum

The bacterial inoculum was produced by transferring two loops of *B. phytofirmans* strain PsJN tagged with green fluorescent protein (Sessitsch et al. 2005) to 100 ml of King’s B liquid medium in 250 ml Erlenmeyer flask incubated at 20°C at 150 rpm for 48 h. Bacteria were collected by centrifugation (3,000 g for 15 min) and washed twice with phosphate-buffer saline (PBS) (10 mM, pH 6.5). The pellet was re-suspended in PBS and used as inoculum. The bacterium concentration was estimated by spectrophotometry (600 nm) and adjusted to  $3 \times 10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup> with PBS (Pillay and Nowak 1997).

### Plant bacterization

Roots of two week-old plantlets were immersed in bacterial inoculum ( $3 \times 10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>) or PBS for 10 s. After inoculation, plantlets were grown as described above for four weeks before cold treatment. Four weeks later, leaves from plantlets were surface sterilized (1 min HClO 2%, twice in PBS for 2 min) and incubated in Petri dishes on solid LB medium during 4 days at 28°C. Endophytic colonization was assessed by visualizing the presence of GFP-tagged strain PsJN around leaves under UV light (see Appendix S1 in Supporting Information).

### Cold treatment

Four weeks later, half of bacterized and non-bacterized plantlets were transferred to a cold growth chamber maintained at 10°C under 16 h light (white fluorescent light, 200  $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) and at 4°C for 8 h dark, whereas the control plants were at 26°C. Each treatment was replicated three times and each replicate consisted of six plantlets.

### Analysis of gene expression

**Sampling, DNase treatment, RNA extraction and synthesis of cDNA.** Leaf samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Leaves were ground in liquid nitrogen to a fine powder and total RNA was extracted from 100 mg powder following the RNA Plant Purification Reagent protocol, according to the manufacturer’s instruction (Invitrogen, France). The RNA pellet was re-suspended in 20  $\mu\text{l}$  of RNase-free water. Genomic DNA was removed and RNA purity and concentration was assessed according to Bordiec et al. (2010). Reverse transcription of RNA was performed with 200 ng of total RNA, using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, France) according to the manufacturer’s protocol.



**Table 1:** Genes analyzed by real-time RT-PCR.

Names	Accession number	Forward primers	Reverse primers
<i>EF1a</i>	BQ799343	5'-AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA-3'	5'-GAACTGGGTGCTTGATAGGC-3'
<i>Chit4c</i>	AY137377	5'-TCGAATGCGATGGTGGAAA-3'	5'-TCCCCTGTCGAAACACCAAG-3'
<i>Gluc</i>	AF239617	5'-TCAATGGCTGCAATGGTGC-3'	5'-CGGTGCGATGTTGCGAGATTA-3'
<i>Chit1b</i>	Z54234	5'-CCCAAGCCTTCCTGCCATA-3'	5'-TGTGATAACACCAAAACCGGG-3'
<i>PAL</i>	X75967	5'-TCCTCCCGGAAAACAGCTG-3'	5'-TCCTCCAAATGCCTCAAATCA-3'
<i>LOX</i>	AY159556	5'-CCCTTCTTGGCATCTCCCTTA-3'	5'-TGTTGTGTCCAGGGTCCATTC-3'
<i>StSy</i>	X76892	5'-AGGAAGCAGCATTGAAGGCTC-3'	5'-TGCACCAGGCATTCTACACC-3'
<i>CBF4</i>	DQ497624	5'-ACCTCACCCGCTCGTTATG-3'	5'-CCGCGTCTCCCGAAACTT-3'

**Real time RT-PCR analysis.** PCR reactions were carried out in duplicates in 96-well plates (25 µl per well) in a reaction buffer containing 1xSYBR Green I mix (PE Biosystems; including Taq polymerase, dNTPs, SYBR Green dye), 280 nM primers (forward and reverse) and a 1:50 dilution of reverse transcribed RNA. PCR conditions were 95°C for 15 s (denaturation) and 60 °C for 1 min (annealing/extension) for 40 cycles on a GeneAmp 5700 sequence Detection System (Applied Biosystems, France). Transcript level was calculated using the standard curve method and normalized against *Efla* gene as an internal control (Terrier et al. 2005). Non-bacterized plantlets grown at 26°C were used as a reference sample.

The genes and the specific primers used in this study were listed in Table 1. They corresponded to genes encoding a phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), a stilbene synthase (*StSy*), three pathogenesis-related (PR) proteins (*Gluc*, *Chit4c*, and *Chit1b*), a lipoxygenase (*LOX*) and the transcription factor *CBF4*.

#### Analysis of stress-related metabolites

**Free proline.** Two hundred µl of the potassium phosphate extract were mixed with 800 µl ninhydrin reagent which contained 1 % (w/v) ninhydrin in 60 % acetic acid (Ait Barka and Audran 1997). The mixture was heated at 100°C for 20 min and then cooled in ice. One ml toluene was added and the sample was vigorously shaken for 15 s. The samples were placed in darkness at room temperature for at least 4 h. The absorbance of the upper phase was then read spectrophotometrically at 520 nm. Proline concentration was determined by using a calibration curve and expressed as µM proline.g<sup>-1</sup> DW.

**Lipid peroxidation (LP) markers.** The lipid peroxidation was evaluated by assaying the concentration of thiobarbituric acid reactive substances according to (Heath and Packer 1968). Fresh leaves were ground in presence of Fontainebleau sand and trichloroacetic acid (TCA) (0.1 % w/v). The homogenate was centrifuged at 4°C for 10 min at 12,000 g. One volume supernatant was mixed with 4 volumes of 20 % TCA containing 0.5 % (w/v) 2-thiobarbituric acid. The mixture was heated at 95°C for 30 min, quickly cooled in ice and centrifuged at 10,000

g for 5 min. The non-specific absorbance of supernatant at 600 nm was subtracted from the maximum absorbance at 532 nm for malondialdehyde (MDA) measurement (Kumar and Knowles 1993) and 455 nm for aldehydes (Meir et al. 1992). For MDA and aldehyde calculation, an extinction coefficient (E) of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  was used for MDA at 532 nm, and an E of  $0.457 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  was used at 455 nm as average of E obtained for aldehydes (propanal, butanal, hexanal, heptanal, and propanal-dimethylacetal) according to Meir et al. (1992). Results were expressed in nmol.g<sup>-1</sup> DW.

**Hydrogen peroxide.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was evaluated according to the method of (Mondal and Choudhuri 1981), with some modifications. Two hundred and fifty mg of leaf powder was homogenised in 1 ml of ice-cold acetone and was centrifuged at 13,500 g for 10 min. Two hundred and fifty µl of cold water and 100 µl of 5 % titanil sulfate were added to supernatant. To this mixture, 500 µl of 1N NH<sub>4</sub>OH solution were added to precipitate the peroxide-titanium complex. After centrifugation at 6,000 g for 5 min, the supernatant was discarded and the pellet was washed with cold acetone. The precipitate was then dissolved in 1.5 ml of 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the final volume adjusted to 2 ml with cold water. The absorbance of the solution was read at 415 nm. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was calculated from a standard curve.

#### Statistical analysis

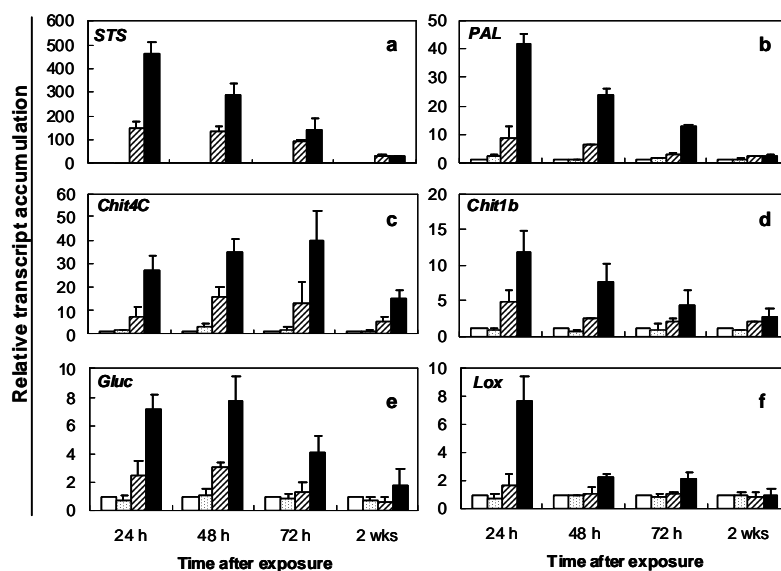
Metabolite and gene expression studies corresponded to 3 independent experiments. Each replicate corresponded to 6 plantlets. Reported data are means ± standard error (SE) of the 3 independent experiments, except *CBF4*, for which reported data are means ± SE of a duplicate of one representative experiment out of 3 independent ones. Standard analysis of the variance (*t* test) was used to assess the significance of the treatment means at *P*<0.05 level.

#### Results

##### Gene expression

We selected several markers covering a large set of defense classes according to previous studies. Three PR protein genes, 2





**Fig. 1.** Defense gene expression of *StSy*, *PAL*, *Chit4c*, *Chit1b*, *Gluc* and *Lox* in leaves of non-bacterized and bacterized grapevine plantlets after 24, 48, 72 h and 2 weeks of cold treatment. Results represent the mean fold increase of mRNA level over control plantlets (non-bacterized, 26°C) referred as 1 x expression level and correspond to means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. White bars: non-bacterized 26°C; dotted bars: bacterized 26°C; striped bars: non-bacterized 4°C; black bars: bacterized 4°C.

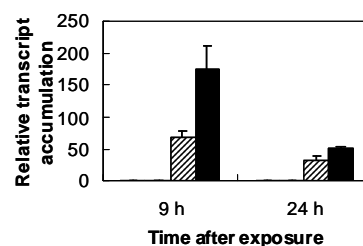
chitinases (*chit4c* and *chit1b*) and a basic glucanase (*gluc*), were chosen for investigation due to their implication in grapevine resistance establishment following pathogen attacks (Aziz et al., 2003; Varnier et al., 2009, Bordiec et al. in press) and for their antifreezing activities (AFPs; Griffith and Yaish 2004). Transcript regulation of lipoxygenase (*LOX*) was also monitored since *LOX* are involved in the synthesis of oxylipins and ROS regulation that play an important role in response to biotic (Bézier et al., 2002; Aziz et al., 2003, Bordiec et al. in press) or cold stress (Ruelland et al. 2009). *PAL* and *STS* were chosen for their role in salicylic acid and resveratrol synthesis respectively, two major compounds implicated in plant responses to stress (Gaudet et al. 2003, Chong et al. 2009), and *CBF4* was recently described as specific marker of cold stress in grapevine (Xiao et al. 2008).

Whatever the gene considered, our results showed that basal levels of gene expression were similar in bacterized and non-bacterized plantlets grown at 26°C (Fig. 1). When plantlets were exposed to low-non freezing temperature (4°C), transcripts of all genes accumulated significantly in both non-bacterized and bacterized plantlets, except for *LOX*. Nevertheless, the accumulation profiles in bacterized and non-bacterized plantlets were significantly different with higher levels measured in the formers (Fig. 1).

After 24 h of cold exposure, *StSy* and *PAL* expression was enhanced in bacterized plantlets by 460 and 40, respectively, whereas it increased only by 150 and 9 in the non-bacterized ones (Figs. 1a, b). After 48 h of cold exposure, transcript levels decreased but remained higher in bacterized plantlets. After two weeks of treatment, no differences were noticed between bacterized and non-bacterized plantlets.

Considering PR proteins, *Chit4c* transcripts accumulated gradually in bacterized plantlets, reaching a peak (40 fold) after 72 h of cold shift (Fig. 1c). After two weeks of treatment, transcript accumulation remained 15 fold above the basal level. In non-bacterized plantlets, the pattern was similar but less amplified. *Chit1b* expression was induced by 12 after 24 h of cold exposure in bacterized plantlets and then decreased gradually until the end of experiment (Fig. 1d). In non-bacterized plantlets, expression was only enhanced by 4 after 24 h. Similarly *Gluc* expression was also stimulated following cold treatment (peak at 48 h), in a higher extent in bacterized plantlets (Fig. 1e).

In contrast to the other tested genes, *LOX* expression was not induced in non-bacterized plantlets after cold exposure (Fig. 1f). Oppositely, bacterization resulted in a transient peak of expression after 24 h of cold treatment (7.5 fold).

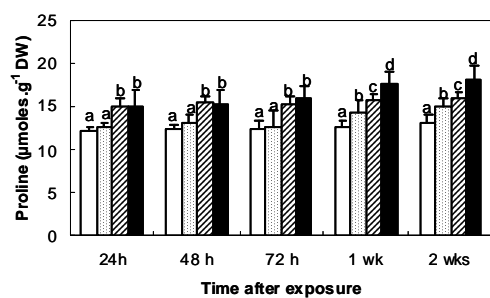


**Fig. 2.** *CBF4* expression in leaves of non-bacterized and bacterized grapevine plantlets after 9 and 24 h of cold treatment. Results represent the mean fold increase of mRNA level over control plantlets (non-bacterized, 26°C) referred as 1 x expression level and correspond to means  $\pm$  SD of a duplicate of one representative experiment out of 3 independent ones. White bars: non-bacterized 26°C; dotted bars: bacterized 26°C; striped bars: non-bacterized 4°C; black bars: bacterized 4°C.

To analyze transcription factor *CBF4* expression, leaves were sampled earlier because it was reported that the peak of *Vitis*





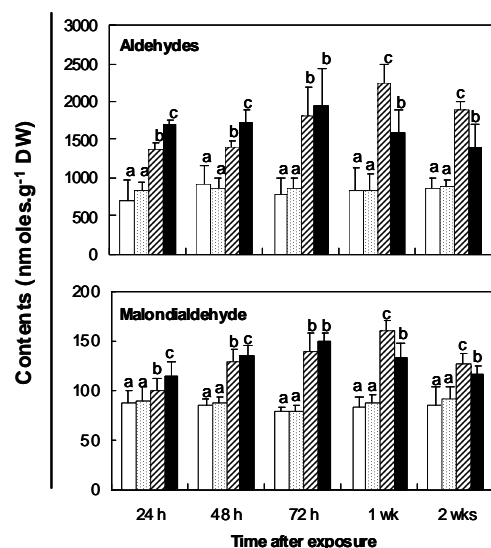


**Fig. 3.** Accumulation of proline in non-bacterized and bacterized grapevine plantlets after 24, 48, 72 h, 1 and 2 weeks of cold treatment. Means indicated with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Data are means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. White bars: non-bacterized 26°C; dotted bars: bacterized 26°C; stripped bars: non-bacterized 4°C; black bars: bacterized 4°C.

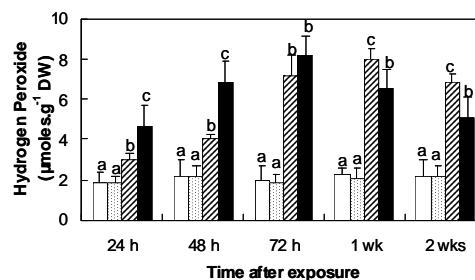
*CBF4* expression following cold stress occurred after 9 h (Xiao et al. 2008). Our results showed that transcript level was up-regulated in plantlets within 9 h after cold exposure (Fig. 2). Gene expression peaked to 60 and 160 fold in non- and bacterized plants respectively. Interestingly, *CBF(1-3)* gene expression, known for their cold responsiveness in grapevine (Xiao et al. 2006), was not induced in this study (data not shown).

#### Proline content

At 26°C, bacterization of grapevine plantlets did not induce significant increase of proline level during the first 3 days (Fig. 3). Beyond the first week, proline content was significantly higher in bacterized plantlets. When bacterized or non-bacterized plantlets were subjected to low non-freezing temperature, they both accumulated proline in a greater extent than plantlets grown at 26°C. But proline over-accumulation was significantly higher in bacterized plantlets after one week of cold exposure.



**Fig. 4.** Accumulation of aldehydes and malondialdehyde in non-bacterized and bacterized grapevine plantlets after 24, 48, 72 h, 1 and 2 weeks of cold treatment. Means indicated with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Data are means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. White bars: non-bacterized 26°C; dotted bars: bacterized 26°C; stripped bars: non-bacterized 4°C; black bars: bacterized 4°C.



**Fig. 5** Accumulation of hydrogen peroxide in non-bacterized and bacterized grapevine plantlets after 24, 48, 72 h, 1 and 2 weeks of cold treatment. Means indicated with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Data are means of 3 independent experiments  $\pm$  SD. White bars: non-bacterized 26°C; dotted bars: bacterized 26°C; stripped bars: non-bacterized 4°C; black bars: bacterized 4°C.

#### Aldehyde and malondialdehyde content

During the sampling period, no significant difference in aldehyde and MDA levels was observed between plantlets grown at 26°C (Fig. 4). However, after exposure to 4°C, both aldehyde and MDA levels increased starting from 24 h, with a stronger effect in the bacterized plantlets. After 72 h of treatment, aldehyde and MDA contents became similar in both bacterized and non-bacterized plantlets. Interestingly, afterwards aldehyde and MDA concentrations significantly decreased in higher proportions in bacterized plantlets.

#### Hydrogen peroxide accumulation

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels was similar between non-bacterized and bacterized grown at 26°C (Fig. 5). By contrast, cold stress induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in both bacterized and non-bacterized grapevine plantlets within the first 72 h of treatment, but in a higher extent in the formers. As for aldehyde and MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content became significantly lower in bacterized plantlets after 1 week of treatment.

#### Discussion

In grapevine plantlets, low temperatures induced the transcription of the cold specific transcription factor *CBF4* after 9 h and later on (24 h) the accumulation of both defense-related gene transcripts and stress-related metabolites. These reactions were stronger in bacterized plantlets. This may be correlated with previous results showing that leaf cells of bacterized plantlets are less affected by deleterious effects of coldness (Ait Barka et al. 2006), and further indicates that *B. phytofirmans* strain PsJN may improve grapevine resistance to low non-freezing temperatures according to the phenomenon of priming (Goellner and Conrath 2008, Conrath 2009). Priming induced by PGPR has been reported several times (De Meyer et al. 1999, Hase et al. 2003, Kim et al. 2004, Verhagen et al. 2004, Tjamos et al. 2005, Van Wees et al. 2008, Verhagen et al. 2010) when studying the induced systemic resistance (ISR) after challenge



with pathogens. Our results demonstrate for the first time priming induced by PGPR upon cold stress.

#### Induction of defense responses upon cold treatment

The induction of defense mechanisms following biotic or abiotic stresses has been well documented. For example, expression of *StSy* genes is often induced in grapevine when submitted to various forms of stresses, including pathogen infection (Preisig-Muller et al. 1999), ozone treatment (Brehm et al. 1999) and UV-light application (Versari et al. 2001). Nevertheless, only poor information is available for grapevine defense mechanisms triggered during cold acclimation. In this work, we showed that *StSy* expression was stimulated after 24 h, as reported previously (Sanchez-Ballesta et al. 2007). Similarly, the induction of *PAL* following cold exposure is in accordance with previous results obtained with other plants using either transcriptomics (Christie et al. 1994, Leyva et al. 1995, Gaudet et al. 2003) or proteomics (Cui et al. 2005).

Chitinases and glucanases are of special interest when studying plant responses to coldness since they exhibit both antifreeze and antifungal activities and have thus been extensively analyzed in plants submitted to cold or pathogen attack (Hon et al. 1995, Van Loon and Van Strien 1999, Yeh et al. 2000, Huang and Duman 2002). Depending on the stress, they may be classified either as AFPs (Griffith and Yaish 2004) or PR (Van Loon and Van Strien 1999) proteins.

In *A. thaliana*, the expression of transcription factors *CBFs* is quickly stimulated (2 h) after cold treatment (Liu et al. 1998, Gilmour et al. 2000). More recently, four *CBF*-like genes, *CBF 1-4*, have been isolated from *Vitis* sp. and were shown to be induced within few hours after exposure to low temperatures, in particular *CBF4* (Xiao et al. 2008). Our data showing a clear induction of *CBF4* expression after 9 h of cold treatment are therefore in accordance with these results.

Apart from gene expression, plant responses to coldness also result from fluctuations of stress-related metabolites such as proline, hydrogen peroxide or aldehydes. Proline is the most well characterized stress responsive molecule and its accumulation is often associated with plant resistance to low temperature, acting as membrane stabilizer, osmo-protector, regulator of enzymes, or scavenger of ROS (Brugiere et al. 1999, Chen and Li 2002, Wang et al. 2008). It is therefore not amazing that in grapevine, accumulation of proline appeared as a response to coldness applied either as a shock (Ait Barka and Audran 1997) or for acclimation (Ait Barka et al. 2006). Besides, chilling temperatures are known to induce the synthesis of ROS, which stimulate LP (Pinhero et al. 1997). Among ROS,  $H_2O_2$  has opposite effects on plant submitted to low temperatures depending on the process of application (Prasad et al. 1994). Under cold shock,  $H_2O_2$  accumulates to damaging levels in plant tissues because of low levels of antioxidant enzymes. By

contrast, in cold acclimated plants,  $H_2O_2$  triggers the synthesis of antioxidant enzymes such as catalase or peroxidase that scavenge ROS and help the plant to overcome cold conditions. In our case, the presence of *B. phytofirmans* in plantlets provokes stronger  $H_2O_2$  accumulation within the first 3 days of cold treatment but also speeds up the decrease of  $H_2O_2$  level after 1 week. Under cold conditions, aldehydes and MDA are produced by the peroxidation of polyunsaturated fatty acids and affect cell membrane fluidity and functions (Barclay and McKersie 1994). In our work, fluctuations of both aldehydes and MDA levels are similar to those reported for  $H_2O_2$ , confirming that *B. phytofirmans* speeds up grapevine reaction to cold shift and later favours the acclimation process to cold temperatures.

#### The priming effect of *B. phytofirmans* strain PsJN

Previous work showed that the presence of the bacterium results in a greater capacity to withstand damage provoked by cold stress (Ait Barka et al. 2006). Our result showed for the first time that the PGPR *B. phytofirmans* strain PsJN acts as a priming agent of grapevine plantlets when submitted to low non-freezing temperatures. Indeed, at 26°C, the level of both stress-related transcripts and metabolites were globally identical in bacterized and non-bacterized plantlets but reactions were stronger in the former after a cold shift. In grapevine, primed expression of defense mechanisms resulting in pathogen resistance has already been demonstrated in plants pretreated with  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) or sulfated laminarin PS3 and challenged with downy mildew (Hamiduzzaman et al. 2005, Slaughter et al. 2008, Trouvelot et al. 2008). Increase resistance to this pathogen in BABA-treated plants was correlated with a stronger ROS accumulation by priming of an NADPH oxidase-dependent ROS production (Dubreuil-Maurizi et al. 2010). Recently grapevine physiological responses have been potentiated against *Botrytis cinerea* by non pathogenic rhizobacteria *Pseudomonas spp* (Verhagen et al. 2010).

*PAL* appears to be a reliable marker of the priming state. It was previously shown that either gene expression or enzymatic activity was higher when (i) tobacco was challenged with tobacco mosaic virus following pretreatment with chemicals (Conrath et al. 1995), (ii) parsley cell suspensions were elicited after benzothiadiazole application (Katz et al. 1998, Thulke and Conrath 1998) or (iii) asparagus was challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi* following salicylic acid treatment (He and Wolyn 2005).

Among the tested genes, *LOX* has a particular behaviour since its expression is not induced in non-bacterized plantlets submitted to coldness but follows the same pattern of expression than the other tested genes in bacterized plantlets. Similarly, it was demonstrated that *LOX* was strongly induced in grapevine following infection with *Plasmopara viticola*, only when infection was preceded by a BABA priming treatment



(Hamiduzzaman et al. 2005). The authors also reported that *LOX* was jasmonic acid (JA)-regulated. The clear potentiated expression of *LOX* in bacterized plantlets after cold shift suggests that JA signal transduction pathway could be involved in the process of cold acclimation induced by *B. phytofirmans*.

The results obtained in this study about oxidative metabolism may appear as incoherent. It is admitted that *LOX* may generate peroxidative damages in plasma membrane through lipid peroxidation (Lee et al. 2005), which is deleterious to plant cells. This is contradictory with the suspected beneficial effect of priming that may facilitate plant reaction to stress. However, one week after cold exposure, the LP markers and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased faster in bacterized than in non-bacterized plantlets, suggesting the occurrence of undefined mechanism that promotes ROS and LP elimination. This may represent a pathway of plant acclimation to cold stress when bacterized.

In this paper, we report for the first time that grapevine priming was induced by a PGPR, significantly helping the plant to withstand cold stress. The state of priming offers a cost-efficient resistance strategy, usually characterized as enabling the plant to react more efficiently to biotic or abiotic stresses by boosting cell defense responses (Conrath et al. 2007, Conrath 2009). Apart from facilitating cold acclimation, it was also shown that *B. phytofirmans* strain PsJN also protects grapevine plantlets against *Botrytis cinerea* (Ait Barka et al. 2000). There is thus some probability that the priming effect induced by *B. phytofirmans* strain PsJN may also participate in the resistance of grapevine bacterized plantlets to grey mould.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank (i) the Greek State Scholarship Foundation (I.K.Y.) for financial support and (ii) Mrs Fanja Rabenoelina for technical assistance.

#### References

- Ait Barka E, Audran JC (1997) Response of champenoise grapevine to low temperatures: changes of shoot and bud proline concentrations in response to low temperatures and correlations with freezing tolerance. *J Hortic Sci* 72:577-582.
- Ait Barka E, Belarbi A, Hachet C, Nowak J, Audran J-C (2000) Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 186:91-95.
- Ait Barka E, Nowak J, Clement C (2006) Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 72:7246-7252.
- Alonso A, Queiroz CS, Magalhaes AC (1997) Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochim Biophys Acta* 1323:75-84.
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bezier A, Lambert B, Joubert JM, Pugin A (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:1118-1128.
- Barclay KD, McKersie BD (1994) Peroxidation reactions in plant membranes: effects of free fatty acids. *Lipids* 29:877-883.
- Bensalim S, Nowak J, Asiedu S (1998) A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. *Am J Potato Res* 75:145-152.
- Bertamini M, Muthuchelian K, Rubinigg M, Zorer R, Nedunchezian N (2005) Low-night temperature (LNT) induced changes of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants. *Plant Physiol Biochem* 43:693-699.
- Bézier A, Lambert B, Baillieul F (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 108:111-120.
- Bordiec S, Paquis S, Lacroix H, Dhondt S, Ait Barka E, Kauffmann S, Jeandet P, Clément C, Baillieul F, Dorey S (in press) Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. *J Exp Bot*.
- Bordiec S, Rabenoelina F, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clément C, Baillieul F (2010) RNA extraction from grapevine woody canes for gene expression analysis by real-time RT-PCR, in *Methodologies and Results in Grapevine Research* (Delrot S, Medrano H, Or E, Bavaresco L and Grando S eds), Springer, pp 290.
- Brehm I, Preisig-Muller R, Kindl H (1999) Grapevine protoplasts as a transient expression system for comparison of stilbene synthase genes containing cGMP-responsive promoter elements. *Zeitschrift fur Naturforschung* 54:220-229.
- Brugiere N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B (1999) Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. *Plant Cell* 11:1995-2012.
- Chen WP, Li PH (2002) Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) cultured cells. *Plant Cell Environ* 25:955-962.
- Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J-K (2006) Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol Plant* 126:52-61.
- Chong J, Poutaraud A, Huguency P (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177:143-155.
- Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194:541-549.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clement C, Ait Barka E (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* 71:1685-1693.
- Conrath U (2009) Priming of induced plant defense responses, in *Adv Bot Res* (Loon LCV ed), Academic Press, Burlington, pp 361-395.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M-A, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendeheene D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2007) Priming: Getting Ready for Battle. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:1062-1071.
- Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7:210-216.



- Conrath U, Chen Z, Ricigliano JR, Klessig DF (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U SA* 92:7143-7147.
- Cui S, Huang F, Wang J, Ma X, Cheng Y, Liu J (2005) A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics* 5:3162-3172.
- De Meyer G, Audenaert K, Höfte M (1999) *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur J Plant Pathol* 105:513-517.
- Dubreuil-Maurizi C, Trouvelot S, Frettinger P, Pugin A, Wendehenne D, Poinssot B (2010)  $\beta$ -aminobutyric acid primes an NADPH oxidase dependent reactive oxygen species production during grapevine-triggered immunity. *Mol Plant-Microbe Interact* 23:1012-1021.
- Flexas J, Badger M, Chow WS, Medrano H, Osmond CB (1999) Analysis of the relative increase in photosynthetic O<sub>2</sub> uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. *Plant Physiol* 121:675-684.
- Fowler S, Thomashow MF (2002) *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14:1675-1690.
- Gaudet DA, Laroche A, Frick M, Huel R, Puchalski B (2003) Plant development affects the cold-induced expression of plant defence-related transcripts in winter wheat. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:175-184.
- Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000) Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* 124:1854-1865.
- Goellner K, Conrath U (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* 121:233-242.
- Griffith M, Yaish MW (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci* 9:399-405.
- Hamiduzzaman MM, Jakab G, Barnavon L, Neuhaus JM, Mauch-Mani B (2005)  $\beta$ -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:819-829.
- Hamman RA, Jr., Dami IE, Walsh TM, Stushnoff C (1996) Seasonal carbohydrate changes and cold hardiness of Chardonnay and Riesling grapevines. *Am J Enol Vitic* 47:31-36.
- Hase S, Van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2003) Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:219-226.
- He CY, Wolyn DJ (2005) Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Plant Pathol* 54:227-232.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189-198.
- Hekneby M, Antolín MC, Sánchez-Díaz M (2006) Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environ Exp Bot* 55:305-314.
- Hendrickson L, Ball MC, Osmond CB, Furbank RT, Chow WS (2003) Assessment of photoprotection mechanisms of grapevines at low temperature. *Funct Plant Biol* 30:631-642.
- Hendrickson L, Ball MC, Wood JT, Chow WS, Furbank RT (2004) Low temperature effects on photosynthesis and growth of grapevine. *Plant Cell Environ* 27:795-809.
- Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC, Yang DS (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* 109:879-889.
- Huang T, Duman JG (2002) Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Mol Biol* 48:339-350.
- Hughes MA, Dunn MA (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot* 47:291-305.
- Katz VA, Thulke OU, Conrath U (1998) A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol* 117:1333-1339.
- Kim MS, Kim YC, Cho BH (2004) Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassicola*. *Plant Biol (Stuttg)* 6:105-108.
- Kumar G, Knowles NR (1993) Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiol* 102:115-124.
- Lee SH, Ahn SJ, Im YJ, Cho K, Chung GC, Cho BH, Han O (2005) Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1194-1198.
- Leyva A, Jarillo JA, Salinas J, Martínez-Zapater JM (1995) Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol* 108:39-46.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1391-1406.
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Aharoni N (1992) Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *J Am Soc Hortic Sci* 117:128-132.
- Mondal R, Choudhuri MA (1981) Role of hydrogen peroxide in senescence of excised leaves of rice and maize. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 176:700-709.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiol Plant* 126:62-71.
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5:388-395.
- Nowak J, Asiedu SK, Lazarovits G (1995) Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plants co-cultured with a plant growth promoting rhizobacterium., in *Ecophysiology and Photosynthetic In Vitro Cultures* (Carre F and Chagvardieff P eds), C.E.A, Aix-en-Provence, pp 173-180.





- Nowak J, Shulaev V (2003) Priming for transplant stress resistance in *In vitro* propagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39:107-124.
- Patton AJ, Cunningham SM, Volenec JJ, Reicher ZJ (2007) Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses: II. Carbohydrate and proline accumulation. *Crop Sci* 47:2170-2181.
- Pillay VK, Nowak J (1997) Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can J Microbiol* 43:354-361.
- Pinhero RG, Rao MV, Paliyath G, Murr DP, Fletcher RA (1997) Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol* 114:695-704.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Preisig-Muller R, Schwekendiek A, Brehm I, Reif HJ, Kindl H (1999) Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. *Plant Mol Biol* 39:221-229.
- Ruelland E, Vaultier M-N, Zachowski A, Hurry V, Jean-Claude Kader and Michel D (2009) Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. *Adv Bot Res* 49:35-150.
- Sanchez-Ballesta MT, Romero I, Jiménez JB, Orea JM, González-Ureña Á, Escribano MI, Merodio C (2007) Involvement of the phenylpropanoid pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO<sub>2</sub> levels. *Postharvest Biology and Technology* 46:29-35.
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka EA, Salles JF, Van Elsas JD, Faure D, Reiter B, Glick BR, Wang-Pruski G, Nowak J (2005) *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1187-1192.
- Sharma VK, Nowak J (1998) Enhancement of *verticillium* wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Can J Microbiol* 44:528-536.
- Slaughter AR, Hamiduzzaman MM, Gindro K, Neuhaus J-M, Mauch-Mani B (2008) Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *Eur J Plant Pathol* 122:185-195.
- Tattersall EA, Grimplet J, DeLuc L, Wheatley MD, Vincent D, Osborne C, Ergul A, Lomen E, Blank RR, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR (2007) Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress. *Funct Integr Genomics* 7:317-333.
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barriau F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Leon C, Renaudin JP, Dedaldechamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* 222:832-847.
- Thomashow MF (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:571-599.
- Thulke O, Conrath U (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *The Plant Journal* 14:35-42.
- Tjamos SE, Flemetakis E, Paplomatas EJ, Katinakis P (2005) Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* 18:555-561.
- Trouvelot S, Varnier AL, Allège M, Mercier L, Baillieux F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert JM, Pugin A, Daire X (2007) A  $\beta$ -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:232-243.
- Uemura M, Steponkus PL (1999) Cold acclimation in plants: Relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *J Plant Res* 112:245-254.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97.
- Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* 11:443-448.
- Varnier AL, Sanchez L, Vatsa P, Boudesocque L, Garcia-Brugger A, Rabenoelina F, Sorokin A, Renault JH, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieux F, Dorey S (2009) Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell & Environment* 32:178-193.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:895-908.
- Verhagen BW, Trotel-Aziz P, Couderchet M, Hofte M, Aziz A (2010) *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J Exp Bot* 61:249-260.
- Versari A, Parpinello GP, Tornielli GB, Ferrarini R, Giulivo C (2001) Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J Agric Food Chem* 49:5531-5536.
- Wang W-j, Chen Y-z, Liu M-q, Lu C-f (2008) Effects of cold-hardening on compatible solutes and antioxidant enzyme activities related to freezing tolerance in *Ammopiptanthus mongolicus* seedlings. *Forestry Studies in China* 10:101-106.
- Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A (2006) Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant Cell Environ* 29:1410-1421.
- Xiao H, Tattersall EA, Siddiqua MK, Cramer GR, Nassuth A (2008) CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant Cell Environ* 31:1-10.
- Xin Z, Browse J (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ* 23:893-902.
- Yeh S, Moffatt BA, Griffith M, Xiong F, Yang DS, Wiseman SB, Sarhan F, Danyluk J, Xue YQ, Hew CL, Doherty-Kirby A, Lajoie G (2000) Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol* 124:1251-1264.



L'exposition des plantes à de basses températures est l'un des stress abiotiques les plus fréquents. Certaines plantes y sont sensibles, d'autres ont développé des mécanismes de défense leur permettant de minimiser les dégâts occasionnés.

En réponse au froid, la croissance de la vigne, son rendement et sa photosynthèse sont affectés (Hendrickson *et al.*, 2003 & 2004 ; Bertamini *et al.*, 2006). Ait Barka *et al.* (2006) ont démontré que des vitroplants entièrement colonisés par *B. phytofirmans* souche PsJN tolèrent mieux le froid que des plants non-bactérisés. Cette protection a notamment été corrélée à une accumulation plus importante d'amidon, de proline et de composés phénoliques. Néanmoins, d'autres réponses de défense mises en place par la plante à la suite d'un stress froid n'ont pas été étudiées.

Dans ce chapitre, nos résultats montrent que cette protection est aussi associée à la potentialisation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses de défense et plus particulièrement à la suite à un stress froid (*Cbf4*, *Lox*, *PAL*, *STS* et ceux codant certaines protéines PR). Parallèlement, une accumulation de proline (osmoprotecteur), ainsi qu'une activation plus rapide des systèmes de détoxification de l' $H_2O_2$  et des aldéhydes ont également été observées.

Le phénomène de potentialisation chez la vigne par des PGPRs ou des éliciteurs (BABA, laminarine sulfatée) a déjà été mis en évidence lors d'attaques par *B. cinerea* et *P. viticola* (Hamiduzzaman, 2005 ; Slaughter *et al.*, 2008 ; Trouvelot *et al.*, 2008 ; Dubreuil-Maurizi *et al.*, 2010 ; Verhagen *et al.*, 2010) mais jamais contre le froid. À notre connaissance, nos résultats sont la première preuve de potentialisation des mécanismes de défense de la vigne par une PGPR lors d'un stress abiotique.

*B. phytofirmans* souche PsJN protège également la vigne contre *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002). Dans le chapitre suivant, nous avons étudié l'interaction vigne/*B. phytofirmans* souche PsJN lors d'une attaque par ce champignon, afin de déterminer si cette protection peut également être associée à la potentialisation de mécanismes de défense.



## Chapitre 3

Caractérisation de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN lorsque la plante est attaquée par *B. cinerea*



## **Publication 4**

### **Protection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) against *Botrytis cinerea* by the endophytic PGPR *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is associated with higher phytoalexin accumulation but not with priming of defense-related gene expression**

Sophie Bordiec<sup>1</sup>, Lucile Jacquens<sup>1</sup>, Alexandra Conreux<sup>2</sup>, Philippe Jeandet<sup>2</sup>, Christophe Clément<sup>1</sup>, Fabienne Baillieul<sup>1</sup>, Sandrine Dhondt<sup>1</sup> and Essaïd Ait Barka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire Stress, Défense et Reproduction des Plantes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

<sup>2</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

En préparation





**Protection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) against *Botrytis cinerea* by the endophytic PGPR *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN is associated with higher phytoalexin accumulation but not with priming of defense-related gene expression (en préparation)**

Sophie Bordiec<sup>1</sup>, Lucile Jacquens<sup>1</sup>, Alexandra Conreux<sup>2</sup>, Philippe Jeandet<sup>2</sup>, Christophe Clément<sup>1</sup>, Fabienne Baillieul<sup>1</sup>, Sandrine Dhondt<sup>1</sup> and Essaïd Ait Barka<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire Stress, Défense et Reproduction des Plantes, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

<sup>2</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC-SE-EA 2069, Laboratoire d'Oenologie et Chimie Appliquée, BP 1039, F-51687 Reims cedex 2, France

\*corresponding author: Essaïd Ait Barka (ea.barka@univ-reims.fr), Tel: +33 3 26 91 34 41

#### ABSTRACT

*Burkholderia phytofirmans* strain PsJN, an endophytic plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) that colonizes grapevine, presents antagonistic properties towards *Botrytis cinerea* and protects the plant against this fungus. However, mechanisms associated with this resistant state by this bacteria are still not elucidated. In this purpose, we investigated some defense-related gene expression and phytoalexin accumulation in

leaves of bacterized and non-bacterized plantlets challenged with *B. cinerea*. Our results showed that protection of grapevine by *B. phytofirmans* strain PsJN against grey mould was not associated with priming of defense-related gene expression. For some selected genes, level of expression was even less induced in bacterized leaves than in non-bacterized ones. However, the observed protection was correlated with priming of phytoalexin accumulation (trans-resveratrol and  $\epsilon$ -viniferin).

**KEYWORDS:** *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN, grapevine, defense responses, priming, *Botrytis cinerea*

#### INTRODUCTION

*Botrytis cinerea*, the causal agent of grey mould, is present worldwide and causes significant economic losses as it is a destructive pathogen of many soft fruits, vegetables and flowers, particularly after harvest (Elad *et al.*, 2004). In grapevine, the disease affects both yield and wine quality (Marchal *et al.*, 2002; Elmer & Reglinski, 2006).

Mechanisms induced in response to *B. cinerea* attacks in grapevine are well-known. These defense responses comprise the accumulation of phytoalexins and pathogenesis-related (PR) proteins (Renault *et al.*, 1996 & 2000; Bézier *et al.*, 2002; Verhagen *et al.*, 2010). An unknown protein named 17.3 was also characterized during grapevine/*B. cinerea* interaction (Bézier *et al.*, 2007). Stilbenes, such as resveratrol, are grapevine phytoalexins and are of particular interest because they can be considered as markers for plant disease resistance and possess biological activity against a wide range of pathogens (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001; Delaunoy *et al.*, 2009).

Control of fungal disease is currently achieved by fungicide applications (Leroux, 2003; Pezet *et al.*, 2004). However, such

treatments have harmful consequences: apparition of new resistant strains, toxicity for producers, consumers, environment and no-targeted organisms (Gerhardson, 2002; Heil & Walters, 2009; Komarek *et al.*, 2010). An alternative for a more sustainable agriculture is the stimulation of natural plant defenses by elicitors or beneficial microorganisms (Gust *et al.*, 2010). Several elicitors have been demonstrated to possess the capacity to protect grapevine against *B. cinerea*: ergosterol (Laquitaine *et al.*, 2006), chitosan (Ait Barka *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2006; Trotel-Aziz *et al.*, 2006), laminarin (Aziz *et al.*, 2003 & 2004), rhamnolipids (Varnier *et al.*, 2009), oligosaccharids (Aziz *et al.*, 2004), salicylic acid (Renault *et al.*, 1996; Derckel *et al.*, 1996 & 1998) and methyl jasmonate (Belhadj *et al.*, 2008; Faurie *et al.*, 2009). Beneficial microorganisms, as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), have the ability to trigger induced systemic resistance (ISR) in plants after pathogen attacks, and may act as biocontrol agents (Compant *et al.*, 2005a; Avis *et al.*, 2008). Several beneficial microbes have shown beneficial effects on grapevine and/or antagonistic properties towards its pathogens: *Burkholderia phytofirmans*, *Trichoderma* sp., *Bacillus* sp.,



*Candida* sp., *Cladosporium* sp., *Ulocladium* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp., *Streptomyces* sp., *Micromonospora* sp. and *Pythium* sp. (Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002; Paul, 2004; Elmer & Reglinski, 2006; Magnin-Robert *et al.*, 2007; Trotel-Aziz *et al.*, 2008; Loqman *et al.*, 2009; Verhagen *et al.*, 2010). After colonization of roots by some beneficial microorganisms or treatment with various chemicals, plants can establish a particular physiological state called primed state upon stress. This situation allows plants to activate defense responses fastly and/or strongly when submitted to subsequent biotic and abiotic stresses, and this phenomenon is frequently associated with enhanced resistance (Conrath & Göllner, 2008; Conrath, 2009).

*B. phytofirmans* strain PsJN, a PGPR isolated from surface sterilized onion roots, is able to colonize several plants such as potato and tomato (Frommel *et al.*, 1991 & 1993; Pillay & Nowak, 1997; Nowak, 1998; Salles *et al.*, 2006) and to protect tomato against *Verticillium dahliae* (Sharma & Nowak, 1998). In grapevine, strain PsJN colonises rhizoplane, penetrates inside roots, and diffuses to leaves and inflorescences (Compant *et al.*, 2005b & 2008). Recently, the species was discovered in leaves of Italian vineyards as a natural endophyte population (Lo Piccolo *et al.*, 2010). Ait Barka *et al.* (2000 & 2002) also demonstrated that strain PsJN is antagonistic to *B. cinerea* *in vitro* and confers to fully-bacterized plantlets a protection against this pathogen.

Nevertheless, the beneficial interaction between grapevine and *B. phytofirmans* strain PsJN needs to be further elucidated, especially how the presence of this bacterium protects grapevine toward grey mould. This study consisted to investigate if fully-bacterized plants might be primed to respond quicker or more efficiently when attacked by *B. cinerea*. In this purpose, selected defense-related gene expression and phytoalexin accumulation were monitored.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant growth

Grapevine plantlets (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay 7535) were micropropagated on modified Murashige and Skoog medium (Martin *et al.*, 1987). Cultures were performed in a growth chamber under fluorescent light ( $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) with 16 h light per day at constant 26°C.

### Preparation of inocula

*B. phytofirmans* strain PsJN tagged *gfp* was cultivated in King's B liquid medium for 2 days at 150 rpm and room temperature. After centrifugation (10 min, 4 000 g), bacteria were resuspended in 10 mM phosphate buffer (PB; pH 6.5). Final bacterial density was adjusted to  $2.8 \cdot 10^8$  CFU/mL by

spectrophotometry (600 nm) according to Pillay & Nowak (1997).

*B. cinerea* strain 630 was grown on solid tomato medium (tomato juice 25% (v/v), agar 2,5% (p/v)) during 20 days at 22°C. Spores were collected and resuspended in sterile potato dextrose broth to a final density of  $10^5$  conidia/mL. After incubation during 6 h at 22°C and 150 rpm, germinated spores were used for plant inoculation.

### Inoculation of *in vitro*-plantlets with *B. phytofirmans* strain PsJN

Roots of 2-week-old plantlets were immersed for 20 s in bacterial solution or sterile PB (control). After inoculation, plantlets were then grown as described above for 4 additional weeks before fungal inoculation.

### Protection assays on detached leaves

Leaves were excised from 6-week-old grapevine plantlets and placed adaxial side downward on wet (distilled water) Whatman 3MM paper in Petri dishes. Two needleprick wounds were applied to the abaxial side of each leaf and covered by 5  $\mu$ L drop of the germinated spore suspension of *B. cinerea*. Quantification of disease development was measured as the average diameter of lesions formed at 40, 48 and 60 hours post-inoculation (hpi) and then compared to control to calculate the % of disease reduction. Twenty-four leaves were inoculated per treatment and experiments were repeated 3 times.

### Fungal inoculation for defense response analysis

Inoculation of pathogen was performed as described above, except that 6 needlepricks wounds and drops were applied on each leaf to contaminate the whole surface. Leaves were sampled 0, 15, 40 and 48 h after challenge, immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C. Twenty leaves were used per treatment and time-course. Experiments were repeated 3 times.

### Analysis of defense gene expression

RNA extraction, DNase treatment to suppress genomic DNA and RT-qPCR were performed according to Bordiec *et al.* (2010). Transcript level was calculated using the standard curve method and normalized against *EF1a* gene as an internal control (Terrier *et al.*, 2005). Genes and specific primers are listed in Table 1. They corresponded to genes encoding an enzyme of the phenylpropanoid pathway (phenylalanine ammonia-lyase; *PAL*), a stilbene synthase (*STS*), a lipoxygenase from the octadecanoid pathway (*LOX*), 4 pathogenesis-related (PR) proteins (a glucanase (*Gluc*), an inhibitor of protease (*PR6*) and 2 chitinases (*Chit1b* and *Chit4c*)) and an unknown protein named 17.3 which was characterized through a differential display screen on *B. cinerea*/grapevine interaction (Bézier *et al.*, 2007).



Table 1: List of primers used in the study.

Names	Accession number	Forward primers	Reverse primers
<i>Chit1b</i>	Z54234	5'-CCCAAGCCTTCCTGCCATA-3'	5'-TGTGATAACACCAAAACCGGG-3'
<i>Chit4c</i>	AY137377	5'-TCGAATGCGATGGTGGAAA-3'	5'-TCCCCTGTCGAAACACCAAG-3'
<i>EF1a</i>	BQ799343	5'-AACCAAAAATATCCGGAGTAAAAGA-3'	5'-GAACTGGGTGCTTGATAGGC-3'
<i>Gluc</i>	AF239617	5'-TCAATGGCTGCAATGGTGC-3'	5'-CGGTCGATGTTGCGAGATTTA-3'
<i>LOX</i>	AY159556	5'-CCCTTCTTGGCATCTCCCTTA-3'	5'-TGTTGTGTCAGGGTCCATTC-3'
<i>PAL</i>	X75967	5'-TCCTCCCGGAAAACAGCTG-3'	5'-TCCTCCAAATGCCTCAAATCA-3'
<i>PR6</i>	AY156047	5'-AGGGAACAATCGTTACCCAAG-3'	5'-CCGATGGTAGGGACACTGAT-3'
<i>STS</i>	X76892	5'-AGGAAGCAGCATTGAAGGCTC-3'	5'-TGCAACAGGCATTCTACACC-3'
<i>17.3</i>	XM002283642	5'-GTACCATCAGACCACCATAAGTAGTG-3'	5'-AGACCAACGGCAAATCAAGTG-3'

### Phytoalexin quantification

One hundred and fifty mg of powdered leaves (ground in liquid nitrogen) were used for phytoalexin extraction. Stilbenes (*trans*-resveratrol and its dimmer  $\epsilon$ -viniferin) were extracted in 375  $\mu$ L of methanol (methanol LCMS chromasolve, Fluka). After incubation at 4°C in the dark for 24 h under agitation (Fisherbrad Mixer, speed 5), samples were centrifugated during 5 min at 10 000 g. Supernatants were used for phytoalexin quantification by HPLC (hplc Waters system, 600 controler pump, 2487 detector, 717 plus autosampler, 5  $\mu$ m ODS2 4.6\*250 mm spherisorb column) according to Jeandet *et al.* (1997).

## RESULTS

### Reduction of *B. cinerea* development in fully bacterized leaves

*B. phytofirmans* strain PsJN has been shown to induce resistance in different plant species, including grapevine challenged with *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002). Here, detached leaves of bacterized plantlets were challenged with the necrotrophic pathogen *B. cinerea* to determine the impact of the presence of this bacterium on disease development. At 40 hpi, average necrosis size for control and bacterized leaves was  $6.6 \pm 1.7$  and  $4.4 \pm 2.6$  mm respectively. Within 48 hpi, control leaves developed large necrotic lesions ( $9.7 \pm 2.8$  mm). Interestingly, detached leaves from bacterized plantlets showed a significant reduction ( $6.5 \pm 3.9$  mm) of grey mould disease ( $P < 0.001$ ),

averaging 33% of symptom reduction for both time-points (Fig 1, 2). The reduction of disease development was maintained in bacterized leaves at 60 hpi (Fig 1). However, lesions of control leaves were unfortunately too large and joined together, making its measurement impossible. The comparison of lesion size was presented in Fig 3. Results showed that control leaves presented mainly (74%) necrosis of medium size ( $4 < d \leq 8$  mm) at 40 hpi, whereas necrosis were smaller ( $d \leq 4$  mm) for bacterized leaves (57%). At 48 hpi, large lesions ( $d > 8$  mm) represented 65% and 30% for control and bacterized leaves respectively, with an important part of small necrosis (33%) for the latest compared to control (4%).

### Analysis of defense gene expression

Used genes were selected according to the main pathways involved in plant defense. PAL and LOX are implicated in the salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) synthesis respectively, both molecules involved in systemic resistance establishment (Pieterse & Van Loon, 2007). STS is implicated in the resveratrol (phytoalexin) synthesis, a major compound of grapevine defense mechanisms (Chong *et al.*, 2009). PR proteins are also important defense metabolites that act directly towards pathogens (van Loon *et al.*, 2006). For example, glucanase (Gluc) and chitinases (like Chit1b and Chit4c) attacks cell walls of pathogen, and inhibitors of proteases (PR6) block action of secreted pathogenic enzymes. The 17.3 protein was reported to be induced in response to *B. cinerea* attacks in grapevine but its function remained unknown (Bézier *et al.*, 2002 & 2007).

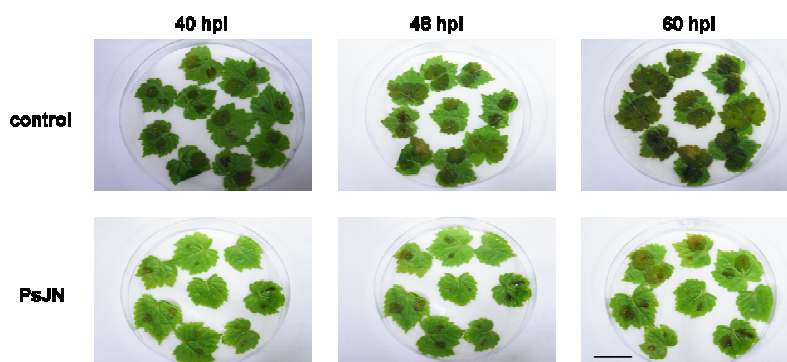


Fig 1: Protection of grapevine leaves against *B. cinerea* after treatment with *B. phytofirmans* strain PsJN. Results are representative of one experiment out of three independent ones. Scale bar: 2 cm.



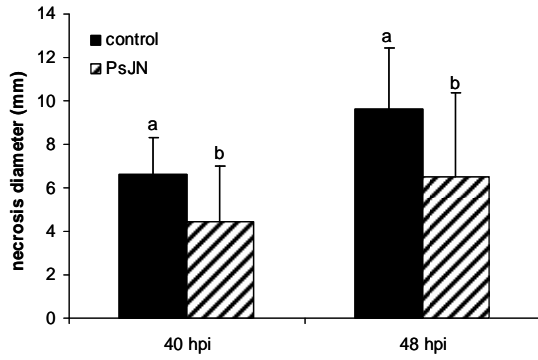


Fig 2: Reduction of *B. cinerea* disease development in detached leaves from control or bacterized plantlets. Means with different letters are significantly different ( $P < 0.001$ ). Results are representative of one experiment out of three independent ones.

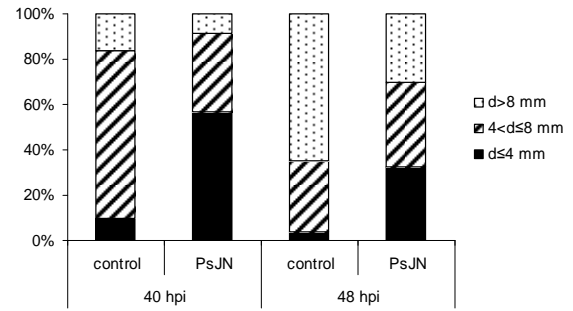


Fig 3: Comparison between the diameter of the lesions in leaves from control and bacterized plantlets 40 and 48 hpi. (d) : necrosis diameter. Results are representative of one experiment out of three independent ones.

Independently of analysed genes, our results showed that gene expressions were repressed (30-70 %) in bacterized leaves compared to control ones at time 0, excepted for *PAL* and *STS* where no changes occurred (Fig 4). Nevertheless, following fungal inoculation, the levels of induction in non-bacterized and bacterized plantlets were different in the most cases, with an induction of expression in higher levels in the formers (Fig 4), contrary to what expected.

*PAL* and *STS* expressions were slightly induced at 15 hpi with

similar level between the two treatments, then reached a maximum at 40 hpi where their expressions were enhanced by 719 and 648 fold respectively in control plants compared to 344 and 352 fold in bacterized ones. At 48 hpi, transcript levels decreased but remained higher in control leaves (2 fold for *PAL*). At 40 hpi, *LOX* was significantly induced in control and bacterized leaves 18 and 9 fold respectively, and these levels were maintained over the time-course for both conditions (Fig 4).

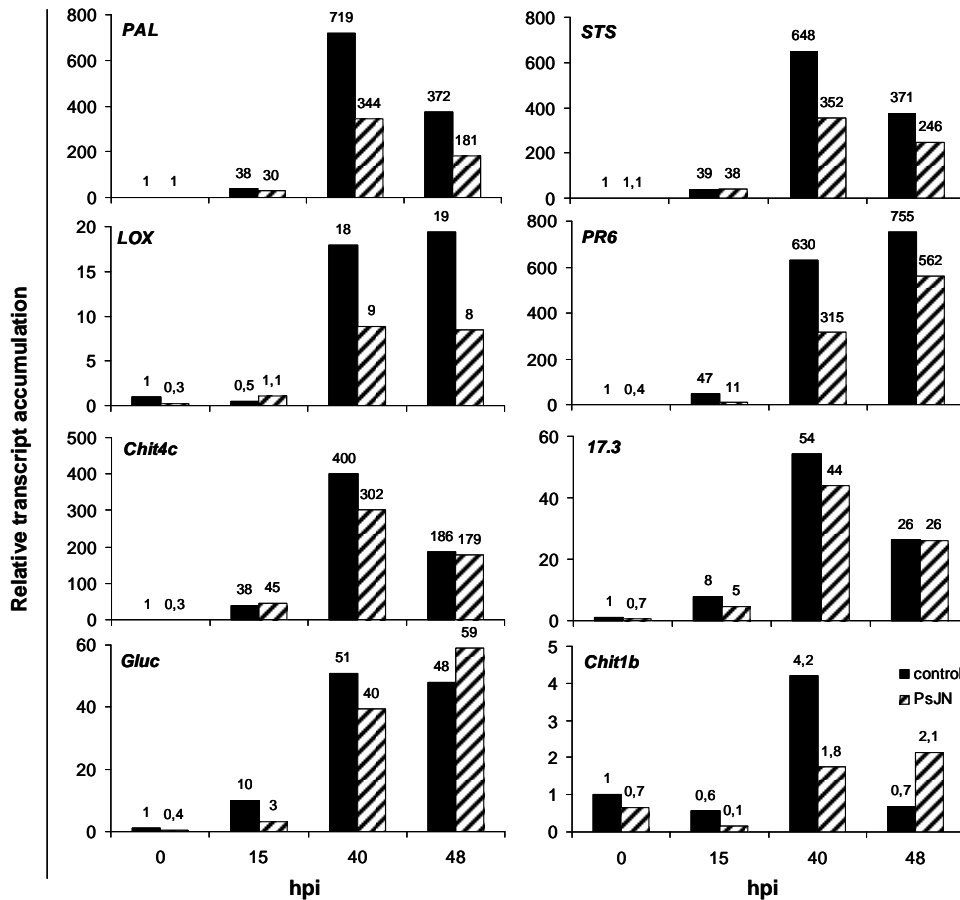


Fig 4: Defense gene expression of *PAL*, *STS*, *LOX*, *PR6*, *Chit4c*, *17.3*, *Gluc* and *Chit1b* in detached leaves of non-bacterized and bacterized grapevine plantlets 0, 15, 40 and 48 hours post challenge with *B. cinerea*. Results are representative of one experiment out of three independent ones.





Considering PR proteins, the highest expression levels were observed for *PR6* and *Chit4C* (Fig 4). From 15 hpi, *PR6* transcripts accumulated gradually with still a higher level in non-bacterized leaves (755 fold) compared to bacterized ones (562 fold) at 48 hpi. For *Chit4c*, the peak was observed at 40 hpi with higher level in control leaves (excepted at 15 hpi where levels were almost similar), then gene expression decreased to similar level for both conditions. *Gluc* was only induced in control leaves at 15 hpi and reached a maximum level (51 fold) at 40 hpi then decreased. Oppositely, transcript level in bacterized leaves increased to a maximum of 59 at 48 hpi. By contrast with the other PR proteins, *Chit1b* seemed to be repressed during the first hours of challenge and only slightly induced in control leaves at 40 hpi.

Considering *17.3*, gene expression reached a maximum at 40 hpi with higher level in control leaves, then decreased to equivalent level for both conditions.

#### Phytoalexin accumulations

In this study, grapevine stilbene (*trans*-resveratrol and its dimer  $\epsilon$ -viniferin) accumulations were quantified by HPLC in leaves from bacterized and non-bacterized plantlets following *B. cinerea* attack (Fig 5). Neither *trans*-resveratrol nor  $\epsilon$ -viniferin could be detected at 0 and 15 hpi for both conditions. However, both phytoalexins increased at 40 hpi in a higher extend for the bacterized plantlets : *trans*-resveratrol and  $\epsilon$ -viniferin were present at 37 and 62  $\mu\text{g/g}$  FW in bacterized plants respectively, compared to 14 and 50  $\mu\text{g/g}$  FW in control ones. At 48 hpi, *trans*-resveratrol level decreased but remained 2 fold higher in bacterized leaves (22  $\mu\text{g/g}$  FW), whereas  $\epsilon$ -viniferin decreased to equivalent level for both conditions (47  $\mu\text{g/g}$  FW). Moreover,  $\epsilon$ -viniferin accumulated more than *trans*-resveratrol in response to *B. cinerea* challenge (Fig 5).

#### DISCUSSION

Improvement of plant resistance by beneficial microorganisms could be linked directly to the antagonistic properties of these microorganisms toward pathogens (competition for nutrients, parasitism, production of metabolites (antibiotics, siderophores or enzymes) or indirectly by inducing an ISR state (Bakker *et*

*al.*, 2003; Compant *et al.*, 2005a; Avis *et al.*, 2008). Enhancement of resistance towards *B. cinerea* by beneficial microorganisms was observed in numerous plants such as tomato (Hmouni *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006), apple (Batta, 2004; Calvo *et al.*, 2007) and strawberry (Ju *et al.*, 2007; Cota *et al.*, 2008). In grapevine, several microorganisms were reported to protect the plants against *B. cinerea* (Elmer & Reglinski, 2006; Magnin-Robert *et al.*, 2007; Loqman *et al.*, 2009; Verhagen *et al.*, 2010). Magnin-Robert *et al.* (2007) showed that severity of disease on leaves and berries under field conditions was reduced to different levels, depending on the bacterial strain. In this study, we showed that *B. phytofirmans* strain PsJN was also able to protect grapevine against this fungus.

Mechanisms involved in response to *B. cinerea* attacks in grapevine are well-documented. It was reported an induction of defense-related gene expression (*PAL*, *STS*, *PGIP*, *CH3*,  $\beta$ -1,3 glucanase and *Chit1b*) in leaves and berries (except *CH3*) (Renault *et al.*, 2000; Bézier *et al.*, 2002), production of phytoalexins (Verhagen *et al.*, 2010), improvement of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase activities (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001; Magnin-Robert *et al.*, 2007). Our results are concomitant with these studies, excepted for *Chit1b* for which no significant induction of gene expression was observed (except at 40 hpi). In contrast, Verhagen *et al.* (2010) showed that phytoalexin accumulation reached a maximum at 72 hpi (40 hpi in this study) but fungal inoculation method was different (non-germinated spores).

The phenomenon of priming was successfully studied on grapevine last years with treatment by laminarin,  $\beta$ -amino butyric acid (BABA) or beneficial bacteria that protects grapevine against various stresses, such as *Plasmopara viticola* (Hamiduzaman *et al.*, 2005; Trouvelot *et al.*, 2008; Slaughter *et al.*, 2008), *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2003; Magnin-Robert *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2010) and chilling (Theocharis, 2010). Improved resistance to grey mould in grapevine by beneficial microorganisms could involve priming of PR protein activities and phytoalexin accumulation (Magnin-Robert *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2010). Recently, Verhagen *et al.* (2010) demonstrated that several strains of *Pseudomonas* spp. primed phytoalexin responses following *B. cinerea* challenge and protected *in vitro* plantlets against this fungus.

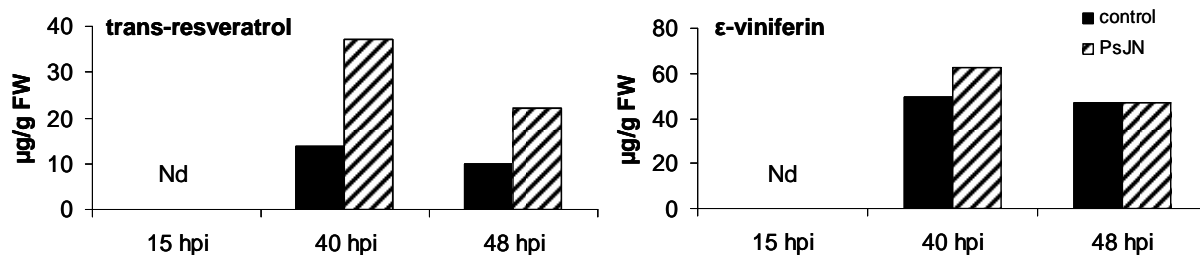


Fig 5: Production of phytoalexins (*trans*-resveratrol and  $\epsilon$ -viniferin) in detached leaves of non-bacterized and bacterized grapevine plantlets challenged with *B. cinerea*. Results are representative of one experiment out of two independent ones. Nd: not determined.



In this study, we demonstrated that bacterized plantlets are more resistant to *B. cinerea* attacks. Surprisingly, our results showed that defense genes in bacterized plantlets were less induced than unbacterized ones, despite the protection. To check if the fungal method of inoculation had an impact on defense gene expression level, leaves were also spray-inoculated in order to contaminate all the leaf surface. The results showed stronger induction of gene expression but with the same profiles (data not shown). In our study, protection of grapevine by strain PsJN was correlated to higher resveratrol accumulation but surprisingly not with priming of *STS* expression, suggesting that strain PsJN had an effect on post-transcriptomic regulation. However, *STS* is encoded by a multigene family, and primers used were not specific of all *STS*. Higher resveratrol accumulation may thereby be correlated to priming of others *STS* expressions. We also hypothesized that increased resistance might be due to post-transcriptomic changes of defense-related molecules (PR proteins) or induction of other genes in bacterized plantlets following *B. cinerea* challenge. It seemed that bacterized plantlets needed to activate less transcription of defense compounds when attacked by the fungus than controlled ones. For example, PR proteins might accumulated in bacterized plantlets since root inoculation and growth of bacterized plantlets.

Moreover, as no protective effect was obtained on detached leaves from only root-colonized plantlets (data not shown), presence of strain PsJN or long interaction with host plant seemed to be primordial for enhancing resistance. In contrast, improved resistance to *B. cinerea* by *Pseudomonas* spp. (Verhagen *et al.*, 2010) was correlated with establishment of an induced systemic resistance state following root inoculation, since bacteria were unable to diffuse from roots to leaves (A. Aziz, personal communication). In previous studies, it was also demonstrated that strain PsJN is antagonistic *in vitro* to *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002), suggesting a part of resistance could be attributed to antagonism. However, this did not explain why gene expression in leaves of bacterized plantlets was less induced. Another plant defense mechanism is the strengthening of cell walls (structural barriers) by accumulation of callose or lignin deposits in order to limit penetration and growth of pathogens (Garcion *et al.*, 2007). During *B. phytofirmans* strain PsJN-grapevine interaction, a host defense reaction coinciding with phenolic compound accumulation and a strengthening of root cell walls during endophytic colonization was reported (Compant *et al.*, 2005b & 2007). We could thus suppose that fully-colonized grapevine plantlets could be submitted to physiological changes after bacterial inoculation and/or that presence of bacteria in leaves challenged with the fungus could prime structural barrier formation and defense compounds.

To better understand enhancement of resistance in grapevine by *B. phytofirmans* strain PsJN following *B. cinerea* challenge, some defense-related gene expression and phytoalexin accumulation were studied. Our results showed that resistance was linked to priming of phytoalexin accumulation but not with priming of defense-related gene expression. In order to get further insight in this phenomenon, it would be interesting to observe physiological changes by microscopy and to study by transcriptomic (microarrays) and proteomic methods the global modifications improved.

## REFERENCES

- Ait Barka E., Eullafroy P., Clément C. and Vernet G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, **22**, 608-614.
- Ait Barka E., Gognies S., Nowak J., Audran J-C. and Belarbi A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, **24**, 135-142.
- Ait Barka E., Belarbi A., Hachet C., Nowak J. and Audran J-C. (2000). Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mold of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **186**, 91-95.
- Avis T.J., Gravel V., Antoun H. and Tweddell R.J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 1733-1740.
- Aziz A., Trostel-Aziz P., Dhuciq L., Jeandet P., Couderchet M. and Vernet G. (2006). Chitosans oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, **96**, 1188-1194.
- Aziz A., Heyraud A. and Lambert B. (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, **218**, 767-774.
- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert B., Joubert J.M. and Pugin A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 1118-1128.
- Bakker P.A.H.M., Ran L.X., Pieterse C.M.J. and van Loon L.C. (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **25**, 5-9.
- Batta Y.A. (2004). Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection*, **23**, 19-26.
- Belhadj A., Telef N., Saigne C., Cluzet S., Barriue F., Hamdi S. and Merillon J.M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 493-499.
- Bézier A., Mazeyrat-Gourbeyre F., Bonomelli A., Varnier A-L., Paquis S., Hachet C., Manteau S., Dorey S., Dhondt-Cordelier S., Clément C. and Baillieul F. (2007). Identification of grapevine genes regulated upon *Botrytis cinerea* infection by differential display. In .Macromolecules and secondary



- metabolites of grapevine and wine (Jeandet P., Conreux A. and Clément C., eds), Lavoisier, Paris, France, 69-74.
- Bézier A., Lambert B. and Baillieul F. (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 111-120.
- Bordiec S., Rabenoelina F., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clément C. and Baillieul F. (2010). RNA extraction from grapevine woody canes for gene expression analysis by real-time RT-PCR. In : Methodologies and Results in Grapevine Research (Delrot S., Medrano H., Or E., Bavaresco L., Grando S., eds), Springer, 290 p.
- Calvo J., Calvente V., de Orellano M.E., Benuzzi D. and Sanz de Tosetti M.I. (2007). Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 251-257.
- Chong J., Poutaraud A. and Hugueney P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, **177**, 143-155.
- Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowak J., Ait Barka E. and Clément C. (2008). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology and Ecology*, **63**, 84-93.
- Compant S., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2007). Polyphenolic compound accumulation as a response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to colonization by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: In Macromolecules from grapevine and vine (Jeandet P., Conreux A. and Clément C., eds), Lavoisier, Paris, France, p 89-93.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2005a). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4951-4959.
- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. and Ait Barka E. (2005b). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1685-1693.
- Conrath U. (2009). Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, **51**, 361-395.
- Conrath U. and Göllner K. (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, **121**, 233-242.
- Cota L.V., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., Macedo P.E.F. and Antunes R.F. (2008). Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control*, **46**, 515-522.
- Coutos-Thévenot P., Poinssot B., Bonomelli A., Yean H., Breda C., Buffard D., Esnault R., Hain R. and Boulay M. (2001). *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *VstI* gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 901-910.
- Delaunois B., Cordelier S., Conreux A., Clément C. and Jeandet P. (2009). Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnology Journal*, **7**, 2-12.
- Derckel J.P., Legendre L., Audran J.C., Haye B. and Lambert B. (1998). Characterization, induction by wounding and salicylic acid and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum*, **104**, 56-64.
- Derckel J.P., Legendre L., Audran J.C., Haye B. and Lambert B. (1996). Chitinases of grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science*, **119**, 31-37.
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. (2004). *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-9.
- Elmer P.A.G. and Reglinski T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, **55**, 155-177.
- Faurie B., Cluzet S. and Mérillon J-M. (2009). Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, **166** (17), 1863-1877.
- Frommel M.I., Nowak J. and Lazarovits G. (1993). Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **150**, 51-60.
- Frommel M.I., Nowak J. and Lazarovits G. (1991). Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*, **96**, 928-936.
- Garcion C., Lamotte O. and Métraux J.P. (2007). Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Balckwell publishing, pp 109-132.
- Gerhardson B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, **20** (8), 338-343.
- Gust A.A., Brunner F. and Nürnberger T. (2010). Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 1-7.
- Hamiduzaman M.M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J.-M. and Mauch-Mani B. (2005). *B*-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 819-829.
- Heil M. and Walters D.R. (2009). Ecological consequences of plant defense signalling. *Advances in Botanical Research*, **51**, 667-716.
- Hmouni A., Mouria A. and Douira A. (2006). Biological control of tomato grey mould with compost water extracts, *Trichoderma* sp., and *Gliocladium* sp. *Phytopathologia Mediterranea*, **45**, 110-116.
- Jeandet P., Breuil A.C., Adrian M., Weston L.A., Debord S., Meunier P., Maume G. and Bessis R. (1997). HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Analytical Chemistry*, **69**, 5172-5177.
- Ju K.H., Lee S.H., Kim C.S., Lim E.K., Choi K.H., Kong H.G., Kim D.W., Lee S-W. and Moon B.J. (2007). Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *Journal of microbiology and Biotechnology*, **17**, 438-444.
- Komarek M., Cadkova E., Chrastny V., Bordsa F. and Bollinger J-C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspect. *Environment International*, **36**, 138-151.



- Laquitaine L., Gomès E., François J., Marchive C., Pascal S., Hamdi S., Atanassova R., Delrot S. and Coutos-Thévenot P. (2006). Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: induction of type I *LTP* promoter activity, *WRKY*, and stilbene synthase gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 1103-1112.
- Lee J.P., Lee S-W., Kim C.S., Son J.H., Song J.H., Lee K.Y., Kim H.J., Jung S.J. and Byung Ju Moon B.J. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, **37**, 329-337.
- Leroux P. (2003). Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus de Biologie*, **326**, 9-21.
- Lo Piccolo S., Ferraro V., Alfonzo A., Settanni L., Ercolini D., Burrano S. and Moschetti G. (2010). Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. *Annals of Microbiology*, **60**, 161-167.
- Loqman S., Ait Barka E., Clément C. and Ouhdouch Y. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 81-91.
- Magnin-Robert M., Tritel-Aziz P., Quantinet D., Biagiatti S. and Aziz A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, **118**, 43-57.
- Marchal R., Tabary I., Valade M., Moncomble D., Viaux L., Robillard B., Duteubre B. and Jeandet P. (2002). Influence de la pourriture grise sur les propriétés moussantes des champagnes. *Le vigneron champenois*, **6**, 52-64.
- Martin C., Vernoy R., Carre M., Vesselle G., Collas A. and Bourgeret C. The vine and techniques of *in vitro* cultivation. *Bulletin de l'OIV*, **675-676**, 447-458.
- Nowak J. (1998). Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **34**, 122-130.
- Paul B. (2004). A new species of *Pythium* isolated from burgundian vineyards and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of the grey mould disease. *FEMS Microbiology Letters*, **234**, 269-274.
- Pezet R., Viret O. and Gindro K. (2004). Plant-microbe interaction: the *Botrytis* grey mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: *Advances in Plant Physiology* (Hemantaranjan A., ed), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7, 71-116.
- Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C. (2007). Signalling cascade involved in induced resistance. In: *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Blackwell Publishing, pp 65-88.
- Pillay V.K. and Nowak J. (1997). Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 354-361.
- Renault A.S., Deloire A., Letinois I., Kraeva E., Tesniere C., Ageorges A., Redon C. and Bierne J. (2000).  $\beta$ -1,3 glucanase gene expression in grapevine leaves as a response to infection with *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*, **51**, 81-87.
- Renault A.S., Deloire A. and Bierne J. (1996). Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *B. cinerea*. *Vitis*, **35**, 49-52.
- Salles J.F., van Elsland J.D. and van Veen J.A. (2006). Effect of agricultural management regime on Burkholderia community structure in soil. *Microbial Ecology*, **52**, 267-269.
- Santos A., Sanchez A. and Marquina D. (2004). Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, **159**, 331-338.
- Sharma V.K. and Nowak J. (1998). Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology*, **44**, 528-536.
- Slaughter R., Hamiduzaman M.M., Gindro K., Neuhaus J.-M. and Mauch-Mani B. (2008). Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology*, **122**, 185-195.
- Terrier N., Glissant D., Grimplet J., Barriou F., Abbal P., Couture C., Ageorges A., Atanassova R., Leon C., Renaudin J.P., Dedaldechamp F., Romieu C., Delrot S. and Hamdi S. (2005). Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta*, **222**, 832-847.
- Theocharis A. (2010). Physiological responses of *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN colonized plantlets of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to low non-freezing temperatures. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, 226p.
- Tritel-Aziz P., Couderchet M., Biagiatti S. and Aziz A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, **64**, 21-32.
- Tritel-Aziz P., Couderchet M., Vernet G. and Aziz A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **114**, 405-413.
- Trouvelot S., Varnier A-L., Allègre M., Mercier L., Baillieul F., Arnould C., Gianinazzi-Pearson V., Klarynski O., Joubert J-M., Pugin A. and Daire X. (2008). A  $\beta$ -1, 3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 232-243.
- van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 135-162.
- Varnier A-L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J.H., Kauffmann S., Pugin A., Clément C., Baillieul F. and Dorey S. (2009). Bacterial rhamnolipides are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell and Environment*, **32**, 178-193.
- Verhagen B.W.M., Tritel-Aziz P., Couderchet M., Höfte M. and Aziz A. (2010). *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 249-260.





*B. phytofirmans* souche PsJN confère à la vigne une protection contre *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002). Dans ces études, les auteurs ont également démontré *in vitro* que la souche PsJN est antagoniste de *B. cinerea*. En revanche, les mécanismes impliqués dans la protection de la plante n'ont pas été déterminés. Ainsi, nous ne savons pas si elle est associée à la potentialisation de mécanismes de défense et/ou uniquement aux propriétés antagonistes de la bactérie.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'expression de gènes de défense (*PAL*, *Lox*, *STS*, *17.3* et ceux codant certaines protéines PR) et quantifier les teneurs en phytoalexines (resvératrol et son dimère, l' $\epsilon$ -viniferine) dans des feuilles de vitroplants entièrement colonisés par la souche PsJN en présence du champignon. L'analyse de l'expression des gènes testés n'a pu révéler la potentialisation de leurs expressions (celles-ci étant même parfois moins induites chez les vitroplants entièrement bactérisés), contrairement aux résultats obtenus dans l'étude précédente (Chapitre2-Publication3). Par contre, cette protection a été associée à une accumulation plus importante de phytoalexines.

Ces résultats sont surprenants, en particulier ceux concernant le resvératrol. En effet, *STS* code la stilbène synthase qui est la dernière enzyme de la voie de biosynthèse du resvératrol. Or nous n'avons pas observé de potentialisation de son expression alors que le resvératrol s'accumule d'avantage dans les feuilles bactérisées. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : (i) des régulations post-transcriptionnelles (hypothèse émise également pour les autres gènes étudiés), et (ii) la *STS* étant codée par une famille multigénique et les amorces utilisées ne ciblant pas la totalité des *STS* présents chez la vigne, il est possible que ce soit l'expression d'autres gènes *STS* qui soit potentialisée.

La présence de la bactérie localement peut également expliquer cette protection dans la mesure où la souche PsJN est antagoniste de *B. cinerea*. De plus, comme nous l'avons démontré dans le Chapitre1-Publication2, ainsi que Compant *et al.* (2005b & 2007), la bactérie induit le renforcement des parois végétales par une accumulation de composés phénoliques, ce constituant une barrière physique plus difficilement franchissable pour le champignon (Garcion *et al.*, 2007).

La même étude réalisée en condition systémique (bactérie présente uniquement au niveau des racines) n'a pas permis de protéger les feuilles contre le champignon. Il semblerait



donc que la présence de la bactérie localement soit nécessaire pour protéger la plante contre cet agent pathogène.

D'autres micro-organismes sont également capables de protéger la vigne contre *B. cinerea* : *Pythium* sp. (Paul, 2004), *Trichoderma* sp., *Ulocladium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens* (Elmer & Reglinski, 2006), des levures (Zahavi *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2004) et des actinomycètes (Loqman *et al.*, 2009). Le phénomène de potentialisation chez la vigne par des PGPRs (en condition systémique) ou des éliciteurs (BABA, laminarine sulfatée) a déjà été mis en évidence lors d'attaques par *B. cinerea* et *P. viticola* (Hamiduzzaman, 2005 ; Slaughter *et al.*, 2008 ; Trouvelot *et al.*, 2008 ; Dubreuil-Maurizi *et al.*, 2010 ; Verhagen *et al.*, 2010). À notre connaissance, nos résultats sont la première preuve de potentialisation de certains mécanismes de défense de la vigne par une PGPR endophyte lors d'un stress biotique.



## CONCLUSIONS





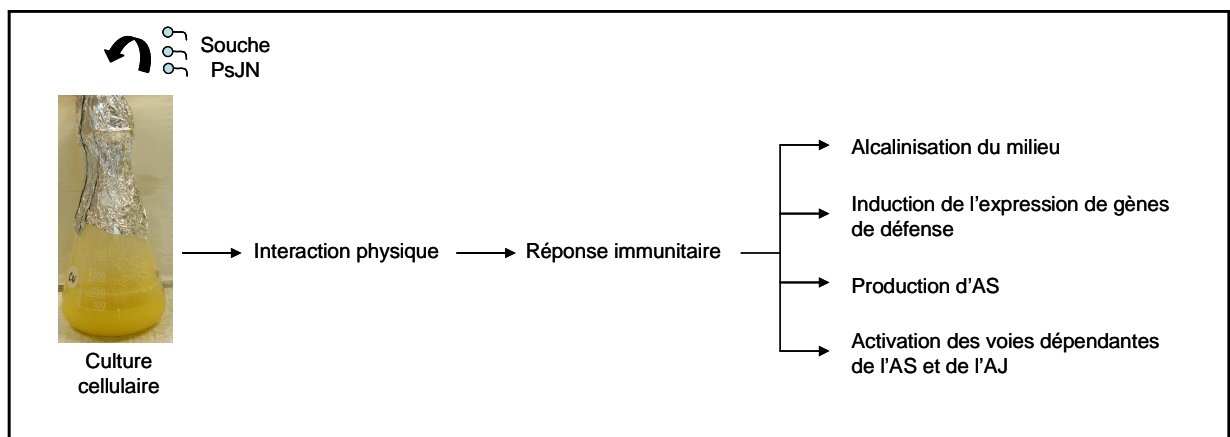


Fig. 35 : Mécanismes de défense induits lors de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN. AJ : acide jasmonique ; AS : acide salicylique.



L'étude des interactions entre les PGPRs et leurs plantes hôtes constitue à l'heure actuelle un enjeu majeur. En effet, leur utilisation, ainsi que celle de molécules élicitrices, rentre dans le contexte de la stimulation des défenses naturelles des plantes, dont la finalité est de réduire l'application des produits phytosanitaires au champ. Les PGPRs renforcent l'état physiologique de leur hôte par la stimulation de leur croissance et l'induction d'une protection contre une large gamme d'agents pathogènes mais les mécanismes d'interaction avec la plante hôte sont encore méconnus. Dans cette thèse, une de ces interactions a été étudiée avec le modèle *Vitis vinifera* L./*B. phytofirmans* souche PsJN. Ainsi, nous avons démontré que *B. phytofirmans* souche PsJN, qui est capable d'établir des populations rhizosphériques et endophytiques avec la vigne (Compant *et al.*, 2005a & 2008a), induit des réponses de défense de la plante (mais à un moindre niveau comparé à une interaction incompatible) et lui confère une protection contre le froid et *B. cinerea*, cette protection étant associée à la potentialisation de certains mécanismes de défense.

### 1-Perception de *B. phytofirmans* souche PsJN par les cellules de vigne

Dans le cadre de cette étude (Chapitre1-Publication1), nous avons tout d'abord comparé les événements précoces induits chez la vigne lorsque celle-ci est en présence de *P. syringae* pv. *lisi* (bactérie non-hôte) ou *B. phytofirmans* souche PsJN (PGPR endophyte ; Fig. 35). Les observations microscopiques montrent que les 2 bactéries interagissent physiquement (dès la première heure après la mise en contact) avec les cellules végétales. Cependant, nos résultats montrent qu'elles sont perçues différemment. En effet, lors de l'interaction cellules de vigne/*P. syringae* pv. *lisi* (réaction non hôte), nous avons observé une alcalinisation en 2 phases du milieu extracellulaire ainsi qu'un 'burst oxydatif' (en 2 phases) et une mort cellulaire, événements caractéristiques d'une RH. En revanche, lors de l'interaction avec la souche PsJN, seule une phase transitoire d'alcalinisation a pu être observée.

Cette différence de perception par les cellules végétales se retrouve également au niveau de l'expression de gènes impliqués dans les réponses de défense (*PIN*, *Gluc*, *Chit4c*, *Lox*, *VvI7.3*). En effet, les résultats montrent que tous les gènes testés sont induits au contact de *P. syringae* pv. *lisi* et *B. phytofirmans* souche PsJN (Fig. 35), mais que les niveaux d'induction sont plus forts lors du contact avec la bactérie non-hôte. L'élicitation des cultures cellulaires par les molécules signal (AS, MeJA) a permis de déterminer quels sont les gènes

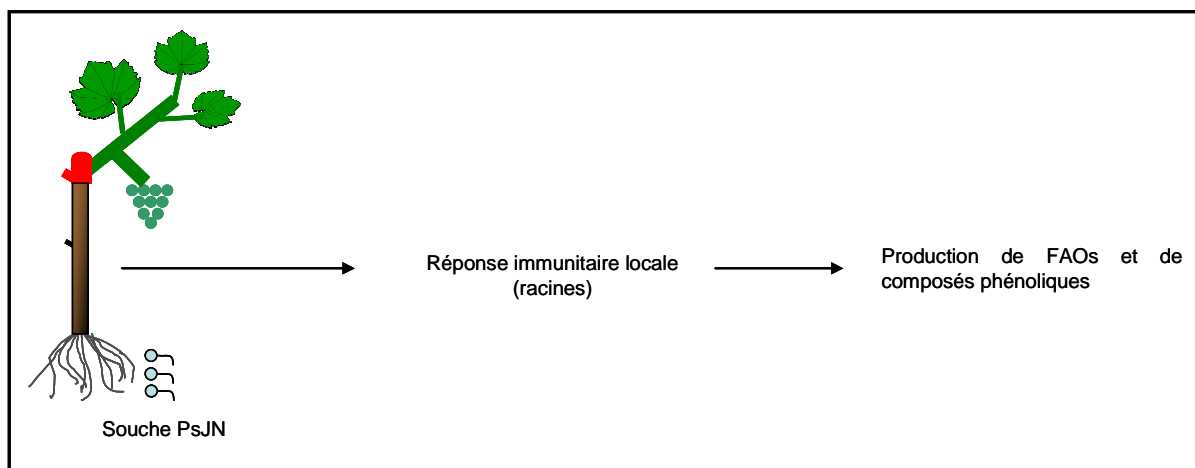


Fig. 36 : Mécanismes de défense induits dans les racines de boutures inoculées par *B. phytofirmans* souche PsJN.

spécifiquement induits en réponse à ces molécules. L'analyse de l'expression de ces mêmes gènes a permis de déterminer que la souche PsJN est capable d'induire simultanément les voies de signalisation dépendantes de l'AS et l'AJ chez la vigne (Fig. 35). La production d'AS et l'activation de la voie dépendante de l'AS lors d'une interaction plante/PGPR ont été très peu décrites (De Meyer *et al.*, 1999 ; Singh *et al.*, 2003 ; Tjamos *et al.*, 2005 ; Domenech *et al.*, 2007 ; Rudrappa *et al.*, 2008), les PGPRs étant connues pour stimuler la voie dépendante de l'AJ/ET (van Loon *et al.*, 2006b). Cependant, Zhang *et al.* (2002) et Conn *et al.* (2008) ont démontré que certaines PGPRs pouvaient induire simultanément les voies dépendantes de l'AS et de l'AJ/ET. Ces travaux de thèse renforcent l'idée que, selon l'interaction plante/PGPR, une ou plusieurs voies de signalisation peuvent être activées ce qui permet l'induction de différentes réponses de défense.

Notre étude a donc permis de caractériser les événements induits dans les cellules de vigne au contact de *B. phytofirmans* souche PsJN mais le(s) MAMP(s) incriminé(s) dans l'induction des réponses de défense n'a pas été déterminé. Cependant, nos résultats semblent nous orienter vers un MAMP issu de la structure propre de la souche PsJN compte-tenu de la rapidité de mise en place de la réponse immunitaire par les cellules de vigne. Il semblerait que le MAMP soit de nature protéique dans la mesure où un traitement de la culture bactérienne par une protéase abolit la mise en place de la réponse immunitaire. De plus, le peptide Flg22 de la souche PsJN est reconnu comme MAMP par *A. thaliana* (Stéphan Dorey, communication orale).

Malgré la perception de la souche PsJN par les cellules de vigne, les réponses de défense mises en place sont plus faibles que celles observées lors de l'interaction avec la bactérie non-hôte. La souche PsJN pourrait donc également contourner la réponse immunitaire par la sécrétion d'effecteurs (indéterminés). De plus, la souche PsJN est capable de dégrader l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (impliqué dans l'activation de mécanismes de défense) produit par les cellules puisqu'aucun burst oxydatif n'a été détecté lors de l'interaction avec la bactérie tandis qu'une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été observée lorsque les cellules interagissent avec un extrait bouilli de la souche PsJN. Enfin, la souche PsJN possède une activité ACC déaminase qui lui permet ainsi de réguler le taux d'éthylène, molécule de signalisation impliquée dans l'induction des réponses de défense et pouvant interagir avec l'AS et l'AJ.

Des réponses de défense ont également été observées lors de la colonisation racinaire de boutures par la souche PsJN (Chapitre1-Publication2 ; Fig. 36). En effet, la colonisation

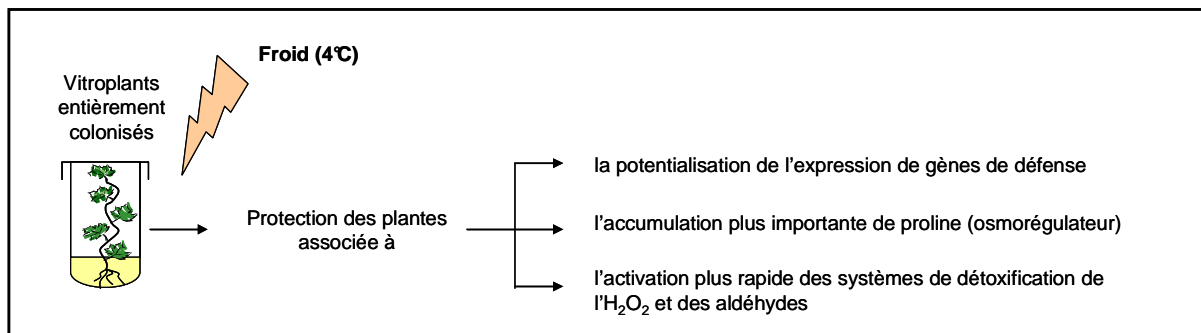


Fig. 37 : Caractérisation de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN lors que la plante est exposée au froid.

épi- et/ou endophytique des racines y induit une accumulation de composés phénoliques, un stress oxydatif et un stress nitrique, alors que la production de FAOs ( $H_2O_2$ ) n'a pas été détectée sur cellules. La production de FAOs par la plante lors de cette interaction semble donc dépendre du modèle d'étude.

## 2-Protection de la vigne contre le froid par *B. phytofirmans* souche PsJN

La potentialisation des réponses de défense par des PGPRs lors de stress biotique et abiotique est bien documentée (Van Wees *et al.*, 2008 ; Conrath, 2009 ; Verhagen *et al.*, 2010).

Il a été démontré que des vitroplants entièrement colonisés par *B. phytofirmans* souche PsJN présentaient une meilleure tolérance au froid (Ait Barka *et al.*, 2006). Afin de mieux caractériser cette protection, différents paramètres physiologiques, l'expression de gènes de défense (*STS*, *PAL*, *Lox*, *Gluc*, *Chit4c*, *Chit1b*) et d'un facteur de transcription (*CBF4*) connu pour être un marqueur du stress froid chez la vigne (Xiao *et al.*, 2008), ont été analysés dans les feuilles de vitroplants exposés à 4°C pendant 2 semaines (Chapitre2-Publication3). Les résultats obtenus révèlent que la protection conférée aux plantes par *B. phytofirmans* souche PsJN est corrélée à la potentialisation de l'expression de tous les gènes testés et de l'augmentation du taux de proline (osmorégulateur), ainsi qu'à une activation plus rapide des systèmes de détoxification des marqueurs de peroxydation des lipides (aldéhydes et malondialdéhydes) et de l' $H_2O_2$  (Fig. 37). Le phénomène de potentialisation chez la vigne par des éliciteurs ou des PGPRs a déjà été mis en évidence lors d'attaques par *B. cinerea* et *P. viticola* (Hamiduzzaman, 2005 ; Slaughter *et al.*, 2008 ; Trouvelot *et al.*, 2008 ; Dubreuil-Maurizi *et al.*, 2010 ; Verhagen *et al.*, 2010). À notre connaissance, ces travaux de thèse constituent la première preuve de potentialisation des mécanismes de défense de la vigne par une PGPR lors d'un stress abiotique.

D'autres composés ou phénomènes physiologiques sont également impliqués dans les mécanismes de défense induits en réponse au froid tels que les sucres et les pigments photosynthétiques (Ruelland *et al.*, 2009). Dans la mesure où des vitroplants de vigne colonisés par la souche PsJN présentent une activité photosynthétique plus forte comparés à des plantes témoins exposés au froid (4°C), une étude actuellement en cours d'analyse porte

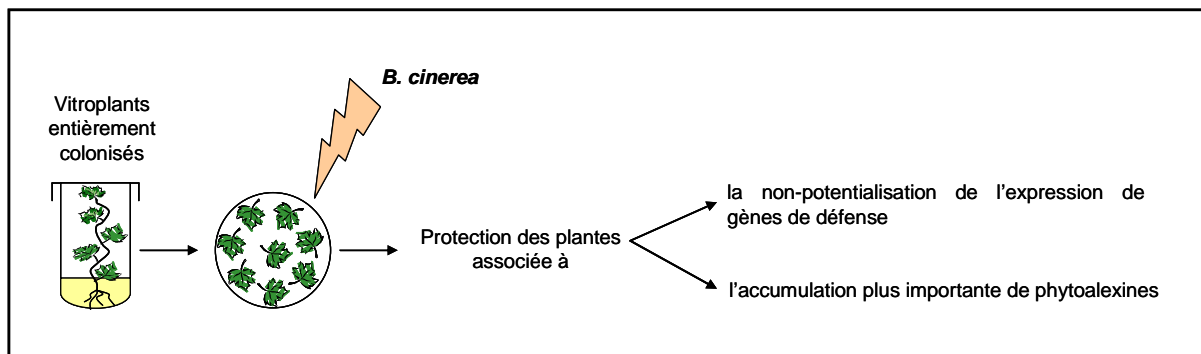


Fig. 38 : Caractérisation de l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN lors que la plante est attaquée par *Botrytis cinerea*.

sur l'implication de la souche PsJN dans l'activité photosynthétique et le métabolisme carboné.

### 3-Protection de la vigne contre *B. cinerea* par *B. phytofirmans* souche PsJN

*B. phytofirmans* souche PsJN possède une activité antagoniste *in vitro* envers le champignon nécrotrophe *B. cinerea* et induit *in vivo* la protection de la plante à l'égard de cet agent pathogène (Ait Barka *et al.*, 2000 & 2002). Sur des feuilles issues de vitroplants entièrement colonisés (Chapitre3-Publication4), l'étude de l'expression de gènes de défense codant des protéines PR (*PR6*, *Chit4c*, *Chit1b* et *Gluc*), la protéine 17.3 (de fonction encore inconnue mais induite lors d'attaques par *B. cinerea*), la Lox et des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (*PAL* et *STS*), a révélé que, contrairement à ce qui a été observé pour la protection contre le froid, la protection contre *B. cinerea* n'est pas associée à la potentialisation de leurs expressions, celles-ci étant même parfois moins induites chez les feuilles bactériées par rapport aux feuilles témoins. En revanche, une accumulation plus importante de phytoalexines (resvératrol et  $\epsilon$ -viniférine) a été observée (Fig. 38). Les gènes testés dans cette étude sont connus pour être induits chez la vigne en réponse à une attaque par *B. cinerea*. Le fait que leur expression soit moins induite chez les plantes colonisées par la souche PsJN en dépit de la protection observée pose la question du rôle de ces composés de défense dans la protection de la vigne contre cet agent pathogène.

La protection observée peut également être associée aux propriétés antagonistes de la souche PsJN envers *B. cinerea*, ainsi qu'aux modifications physiologiques que la bactérie a pu induire chez la plante depuis l'inoculation des racines (accumulation de composés de défense, renforcement des parois).

### 4-Conclusion générale

Ces différents résultats démontrent donc que *B. phytofirmans* souche PsJN est perçue par la vigne et induit localement des mécanismes de défense mais à un niveau moindre comparé aux agents non-hôte. Néanmoins, en l'absence de symptômes de maladie, la souche PsJN est donc dans un premier temps reconnue par la plante comme un agent pathogène. Puis une relation bénéfique s'établit très vite, celle-ci se manifestant par la promotion de





croissance et la mise en place d'une protection contre le froid (4°C) et *B. cinerea* via la potentialisation de certains mécanismes de défense qui ne sont pas encore tous définis. Afin de déterminer si la présence de la bactérie localement est indispensable pour induire ces protections, des études préliminaires ont été menées en condition systémique. Dans la mesure où aucune protection contre ces stress (froid et *B. cinerea*) n'a été observée, il semblerait donc que la présence de *B. phytofirmans* souche PsJN localement soit un facteur déterminant pour l'établissement de la résistance.



# PERSPECTIVES



Les différents résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont permis de mieux comprendre l'interaction entre la vigne et *B. phytofirmans* souche PsJN. Cependant, différents points complémentaires peuvent être envisagés d'un point de vue fondamental et appliqué.

## 1-Aspect fondamental

Le froid affectant la photosynthèse de la plante, il serait utile d'étudier si la souche PsJN a un impact sur le **métabolisme carboné**. En effet, Ait Barka *et al.* (2006) ont démontré que la photosynthèse est moins affectée chez les vitroplants bactérisés exposés à 4°C par rapport à des plantes non-bactérisées, et qu'il y avait davantage d'amidon dans les premiers. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'ensemble de **l'activité du photosystème** de la plante (activité photosynthétique, échanges gazeux), l'activité d'**enzymes** impliquées dans le métabolisme carboné (amylase, invertase...), et de quantifier certains **sucres** (glucose, raffinose, saccharose), ces derniers étant impliqués dans les réponses de défense à la suite d'un stress par le froid en plus de leur effet osmorégulateur (Ruelland *et al.*, 2009).

De plus, dans notre étude (Chapitre2-Publication3), nous avons uniquement analysé les feuilles. L'étude des réponses mises en place dans les **autres organes** (racines et tiges) permettrait de déterminer si les réponses de défense diffèrent suivant l'organe considéré, même si tous sont colonisés par la bactérie au moment du stress.

Dans nos différentes études, nous avons analysé l'expression de divers gènes impliqués dans les réponses de défense, notamment *PAL*, *Lox*, *STS*, *CBF4* ainsi que certains gènes codant des protéines PR. Bien que ces derniers représentent des marqueurs couvrant les principales voies de défense activées par la plante lors d'un stress, ils ne représentent qu'une faible proportion de tous les moyens dont la plante dispose pour se défendre. Par exemple, Bézier *et al.* (2007) ont observé l'induction d'autres gènes codant des protéines PR lors de l'interaction vigne-*B. cinerea*. L'approche globale utilisant des **puces à ADN** permettrait d'évaluer de manière générale les modifications physiologiques engendrées par *B. phytofirmans* souche PsJN sur la vigne au niveau transcriptomique. Une **approche protéomique** devrait également être envisagée dans la mesure où les modifications post-traductionnelles peuvent refléter des différences avec les résultats obtenus grâce aux puces à ADN. Des dosages d'**activité enzymatique** pourront aussi être réalisés, notamment le dosage



des activités chitinase et glucanase qui sont impliquées dans la résistance contre *B. cinerea* (Magnin-Robert *et al.*, 2007 ; Verhagen *et al.*, 2010).

Nos résultats suggèrent que les voies de signalisation de l'AS et de l'AJ sont induites au niveau local lors de l'interaction cellules de vigne-*B. phytofirmans* souche PsJN. De plus, nous avons observé une production d'AS mais l'AJ n'a pas pu être quantifié dans cette étude. L'étude des réponses locales induites par la souche PsJN devra donc aussi être réalisée sur d'autres modèles d'étude (vitroplants et boutures), afin de s'assurer que les réponses de défense mises en place localement ne diffèrent pas selon le modèle d'étude.

De plus, en utilisant ces 2 modèles (vitroplants et boutures), il sera possible de déterminer quelles voies de signalisation sont impliquées en condition systémique. Toutefois, lors d'une interaction plante-PGPR, il a été démontré que la signalisation *via* l'AJ au niveau systémique se fait en synergie avec l'ET (Pieterse & van Loon, 2007). Il est donc possible que l'ET soit également impliqué dans l'interaction que nous étudions. Le **dosage des principales molécules de signalisation** impliqués dans les voies de signalisation (AS, AJ et ET) permettrait donc de déterminer lesquels jouent un rôle déterminant dans l'établissement de la résistance locale ou systémique et si le message de défense diffère selon l'organe considéré ou selon le modèle d'étude utilisé.

Une **approche pharmacologique** pourrait également être envisagée sur la vigne par l'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation. Par ailleurs, des expériences menées sur *A. thaliana* (pour laquelle les ressources génétiques sont considérables et facilement accessibles), permettraient de déterminer plus précisément les voies ou les métabolites essentiels dans l'établissement de la résistance. Par exemple, des mutants affectés dans la synthèse ou la perception de l'AS, l'AJ et/ou l'ET, des mutants déficients dans la synthèse de la camalexine (phytoalexine de l'arabette) et des mutants *Cbf1* (analogue de *Cbf4* chez la vigne) pourraient être utilisés. Cependant, les résultats obtenus chez l'arabette ne seront pas forcément le reflet de ce qui se passe chez la vigne, les 2 plantes étant assez éloignées physiologiquement.

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de caractériser l'interaction entre la vigne et la souche PsJN lors de la perception de la bactérie par la plante ou lors d'un stress (exposition à 4°C ou infection par *B. cinerea*). Néanmoins, ces résultats laissent des questions en suspens : (i) quels sont les **déterminants de la bactérie** permettant l'élicitation de certaines réponses de défense lors de la perception de la bactérie (ou de ses





MAMPs) par la plante, et (ii) la **présence de la souche PsJN localement** est-elle indispensable pour protéger la plante contre le froid et *B. cinerea* ?

Les MAMPs des PGPRs sont variés : LPS, autres composants de la paroi, flagelline, molécules secrétées (Ongena *et al.*, 2007 ; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2007 ; van Loon *et al.*, 2008 ; Verhagen *et al.*, 2010). Pour *B. cepacia* et *B. plantarii* (agents pathogènes), il a été démontré que leur principal MAMP est de type LPS (Gerber & Dubery, 2004 ; Gerber *et al.*, 2004). En revanche, dans notre étude (Chapitre 1-Publication1), des expériences préliminaires ont permis de déterminer que le MAMP de *B. phytofirmans* souche PsJN serait de nature protéique (données non publiées). La caractérisation de ce MAMP faciliterait l'application au vignoble *via* un traitement éliciteur comparé à l'utilisation de la bactérie vivante.

Les expériences menées sur des vitroplants entièrement colonisés par la souche PsJN ont permis de déterminer que la présence de la bactérie localement permet de protéger la vigne contre le froid (4°C) et *B. cinerea*. En revanche, en condition systémique, aucune protection contre le froid n'a été observée pour des boutures où la bactérie était uniquement présente au niveau des racines, le modèle vitroplant n'ayant pu être retenu compte-tenu de la trop grande vitesse de propagation de la bactérie (Compant *et al.*, 2005b). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat : (i) le froid appliqué n'était pas suffisant, les boutures étant peut-être plus résistantes que les vitroplants du fait de leur anatomie, et dans ce cas il faudrait réitérer l'expérience avec un froid plus intense ; (ii) la souche PsJN est incapable d'induire une ISR et donc la présence de la bactérie localement est indispensable pour induire la résistance ; et (iii) le modèle bouture se comporte différemment du modèle vitroplant. En revanche, le test de protection contre *B. cinerea* en condition systémique a été réalisé sur des feuilles de vitroplants dont seules les racines étaient colonisées par la souche PsJN (aucune protection n'avait été observée). La même étude sur le modèle bouture devra être menée afin de s'assurer que le modèle étudié n'influe pas sur les résultats.

*B. phytofirmans* souche PsJN étant capable de protéger la vigne contre le froid et *B. cinerea*, des expériences complémentaires devront être menées afin de déterminer si la bactérie est capable de protéger la plante contre d'**autres agents pathogènes** (*Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* ou les champignons responsables de l'esca) ou d'**autres stress abiotiques** (carences, UV, sécheresse).

Enfin, le génome de *B. phytofirmans* souche PsJN ayant été entièrement séquencé, des études menées avec des mutants de cette bactérie permettront de caractériser les facteurs



bactériens intervenant dans la colonisation racinaire de la vigne et dans l'établissement des populations endophytiques, ainsi que ceux impliqués dans la promotion de croissance et la protection de la plante contre le froid et *B. cinerea*. Des mutants *H41* et *acds* pourraient par exemple être envisagés (*cf* paragraphe 4.3.1).

## 2-Aspect appliqué

### 2.1-Présence de *B. phytofirmans* souche PsJN dans le vignoble français ?

Bien que l'espèce ait été récemment isolée dans des feuilles de plants de vigne italiens (Lo Piccolo *et al.*, 2010), la présence de *B. phytofirmans* souche PsJN dans le vignoble français n'a pas encore été établie à ce jour. La réglementation française est très restrictive concernant l'application d'un micro-organisme (directive 2001/36/CE), particulièrement quand celui-ci n'est pas d'origine française. La découverte de cette souche sur notre territoire faciliterait ainsi les démarches pour son application au vignoble.

### 2.2-Application au vignoble

Les résultats obtenus en laboratoire concernant les effets bénéfiques de *B. phytofirmans* souche PsJN sur la vigne devront être confirmés au vignoble en vue d'une application réelle en lutte biologique : colonisation de la plante, promotion de croissance, protection contre le froid et *B. cinerea*. D'autres tests permettront également de déterminer si la souche PsJN est capable de protéger la vigne contre d'autres agents pathogènes (par exemple *P. viticola* et *E. necator*) ou des stress abiotiques ('freezing', UV, sécheresse). Dans le cas où une protection serait constatée, son utilisation au vignoble permettrait de réduire celle des produits phytosanitaires et serait donc une approche plus respectueuse de l'environnement. Nous ne savons également pas si la bactérie peut se maintenir au cours du temps au sein de la plante, ni si elle est capable de survivre aux traitements chimiques appliqués au vignoble. Il faudra donc établir combien de temps la bactérie persiste dans la plante, afin de déterminer le nombre d'applications à effectuer au cours de l'année. Enfin, une étude environnementale devra être conduite afin d'évaluer l'impact de la présence de la souche PsJN sur la faune et la flore locales.



Dans cette thèse, la protection contre *B. cinerea* a été observée uniquement sur les feuilles. Or, au vignoble, ce sont les baies qui sont principalement infectées par ce champignon. Il faudra donc s'assurer que la souche PsJN protège aussi les baies contre cet agent pathogène, le modèle bouture permettant d'obtenir très difficilement des baies mûres en laboratoire.

Afin de mener ces expériences au vignoble, plusieurs stratégies peuvent être envisagées : (i) inoculation du sol (au vignoble) par des solutions bactériennes fortement concentrées, (ii) inoculation de la souche PsJN au niveau des plaies de taille (au vignoble), (iii) inoculation de la bactérie sur des vitroplants qui seront acclimatés par la suite et (iv) bactérisation de jeunes plants (disponibles chez les pépiniéristes) avant leur introduction au vignoble.

### 2.3-Impact de *B. phytofirmans* souche PsJN sur la vinification

La qualité des baies de raisin au moment des vendanges est une étape clé pour l'élaboration des vins, et il a été démontré que la présence de *B. cinerea* dans les baies mûres altérerait la qualité des vins (Darriet *et al.*, 2000 & 2001 ; Marchal *et al.*, 2002). Dans le cas où la souche PsJN serait présente dans les baies mûres, il faudra s'assurer qu'elle ne modifie pas la qualité des baies et que cette présence n'interfère pas avec le processus de vinification.



## BIBLIOGRAPHIE

Les références citées dans les articles de ce manuscrit ne sont pas reprises dans cette bibliographie.





- Achard P., Renou J.P., Berthome R., Harberd N.P. et Genschik P. (2008). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology*, **18**, 656-660.
- Adam A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat, Université de Liège, Belgique, 165 pages.
- Adie B.A., Perez-Perez J., Pérez-Pérez M.M., Godoy M., Sánchez-Serrano J.J., Schmelz E.A. et Solano R. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 1665-1681.
- Adrian M., Daire X., Jeandet P., Breuil A.C., Weston L.A., Bessis R. et Bourdon E. (1997). Comparisons of stilbene synthase activity (resveratrol amounts and stilbene synthase mRNAs levels) in grapevines treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. *American Journal of Oenology and Viticulture*, **48**, 394-395.
- Adrian M., Jeandet P., Bessis R. et Joubert J.M. (1996). Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride (AlCl<sub>3</sub>). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**, 1979-1981.
- Aimé S., Cordier C., Alabouvette C. et Olivain C. (2008). Comparative analysis of PR-gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **73**, 9-15.
- Ait Barka E., Nowak J. et Clément C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7246-7252.
- Ait Barka E., Eullafroy P., Clément C. et Vernet G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, **22**, 608-614.
- Ait Barka E., Gognies S., Nowak J., Audran J-C. et Belarbi A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control*, **24**, 135-142.
- Ait Barka E., Belarbi A., Hachet C., Nowak J. et Audran J-C. (2000). Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mold of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **186**, 91-95.
- Alexander D., Goodman R.M., Gut-Rella M., Glascock C., Weymann K., Friedrich L., Maddox D., Ahl-Goy P., Luntz T., Ward E. et Ryals J. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **90**, 7327-7331.
- Alexandre C.M. et Hennig L. (2008). FLC or not FLC: The other side of vernalization. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1127-1135.
- Amborabé B.E., Rossard S., Pérouault J.M. et Roblin G. (2003). Specific perception of ergosterol by plant cells. *Comptes Rendus de Biologie*, **326**, 363-370.
- Anderson J-P., Badruzaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R. et Kazan K. (2004). Antagonistic interaction between abscissic acid and jasmonate-ethylene signalling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 3460-3479.
- Araujo W.L., Maccheroni Jr W., Aguilar-Vildoso C.I., Barroso P.A.V., Saridakis H.O. et Azevedo J.L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**, 229-236.
- Aspray J.T., Eirian Jones E., Whipps J.M. et Bending G.D. (2006). Importance of mycorrhization helper bacteria cell density and metabolite localization for the *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* symbiosis. *FEMS Microbiology Ecology*, **56**, 25-33.
- Atkinson M.M., Keppler L.D., Orlandi C.J., Baker C.J. et Mischke C.F. (1996). Syringolide 1 triggers Ca<sup>2+</sup> influx, K<sup>+</sup> efflux, and extracellular alkalisation in soybean cells carrying the disease resistance gene *Rpg4*. *Plant Physiology*, **112**, 297-302.
- Attaran E., Zeier T.E., Griebel T. et Zeier J. (2009). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* is independent of methyl salicylate production and jasmonate signalling. *Plant Cell*, **21**, 954-971.
- Avis T.J., Gravel V., Antoun H. et Tweddell R.J. (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and



- productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 1733-1740.
- Audenaert K., Pattery T., Cornélis P. et Höfte M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, 1147-1156.
- Aziz A., Gauthier A., Bézier A., Poinssot B., Joubert J.-M., Pugin A., Heyraud A. et Baillieux F. (2007). Elicitor and resistance-inducing activities of  $\beta$ -1, 4 cellodextrins in grapevine, comparison with  $\beta$ -1, 3 glucans and  $\alpha$ -1, 4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1463-1472.
- Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhucq L., Jeandet P., Couderchet M. et Vernet G. (2006). Chitosans oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, **96**, 1188-1194.
- Aziz A., Heyraud A. et Lambert B. (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, **218**, 767-774.
- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert B., Joubert J.M. et Pugin A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 1118-1128.
- Backman P.A. et Sikora R.A. (2008). Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control*, **46**, 1-3.
- Bajguz A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**, 95-107.
- Bailey B.A., Strem M.D. et Wood D. (2009). *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological Research*, **113**, 1365-1376.
- Bakker P.A.H.M., Ran L.X., Pieterse C.M.J. et van Loon L.C. (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **25**, 5-9.
- Balandreau J. et Mavingui P. (2007). Beneficial interactions of *Burkholderia* spp. with plants. In: *Burkholderia*, molecular microbiology and genomics (Coenye T. and Vandamme P., eds), Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, pp 129-152.
- Balandreau J., Viallard V., Cournoyer B., Coenye T., Laevens S. et Vandamme P. (2001). *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 982-985.
- Baldani V.L., Oliveira E., Balota E., Baldani J.I., Kirchhof G. et Döbereiner J. (1997). *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma species de bacteria diazotrofica endofítica. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **69**, 116.
- Bari R. et Jones J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, **69**, 473-488.
- Bayman P. (2007). Fungal endophytes. In *Environmental and Microbial Relationships*, 2<sup>nd</sup> edition, The Mycota IV (Kubicek C.P. and Druzhinina eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 213-227.
- Beckers G.M.J., Jaskiewicz M., Liu Y., Underwood W.R., He S.Y., Zhang S. et Conrath U. (2009). Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **21**, 944-953.
- Beckers G.J. et Spoel S.H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, **8**, 1-10.
- Belhadj A., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet M.F. et Merillon J.M. (2008a). Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 5781-5787.
- Belhadj A., Telef N., Saigne C., Cluzet S., Barrieu F., Hamdi S. et Merillon J.M. (2008b). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 493-499.
- Belhadj A., Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet M.F. et Merillon J.M. (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 9119-9125.
- Bell C.R., Dickie G.A., Harvey W.L.G. et Chan J.W.Y.F. (1995). Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, **41**, 46-53.



- Benhamou N., Kloepper J.W., Quadt-Hallman A. et Tuzun S. (1996). Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology*, **112**, 919-929.
- Bent E. (2006). Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). In: Multigenic and Induced systemic resistance in plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp 225-258.
- Bertamini M., Muthuchelian K., Rubinigg M., Zorer R., Velasco R. et Nedunchezian N. (2006). Low-night temperature increased the photoinhibition of photosynthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, **57**, 25-31.
- Bézier A., Mazeyrat-Gourbeyre F., Bonomelli A., Varnier A-L., Paquis S., Hachet C., Manteau S., Dorey S., Dhondt-Cordelier S., Clément C. and Baillieul F. (2007). Identification of grapevine genes regulated upon *Botrytis cinerea* infection by differential display. In: Macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wine (Jeandet P., Clément C. and Conreux A., eds), Lavoisier, Paris, France, pp 69-74.
- Bézier A., Lambert B. et Baillieul F. (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 111-120.
- Bleecker A.B. et Kende H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16**, 1-18.
- Bloemberg G.V. et Lugtenberg B.J.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 343-350.
- Boller T. et Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 379-406.
- Bonmatin J.M., Laprevote O. et Peypoux F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **6**, 541-556.
- Bonomelli A., Mercier L., Franchel J., Baillieul F., Benizri E. et Mauro M.C. (2004). Response of grapevine defenses to UV-C exposure. *American Journal of Enology and Viticulture*, **55**, 60-64.
- Borie B., Jeandet P., Parize A., Bessis R. et Adrian M. (2004). Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American Journal of Enology and Viticulture*, **55**, 60-64.
- Bouarab K., Potin P., Correa J. et Kloareg B. (1999). Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. *The Plant Cell*, **11**, 1635-1650.
- Bowling S.A., Clarke J.D., Liu Y., Klessig D. et Dong X. (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The Plant Cell*, **9**, 1573-1584.
- Bowling S.A., Guo A., Cao H., Gordon A.S., Klessig D. et Dong X. (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, **6**, 1845-1857.
- Broekaert W.F., Delauré S.L., De Bolle M.F.C. et Cammue B.P.A. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 393-416.
- Brosché M. et Strid A. (2003). Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum*, **117**, 1-10.
- Bru R., Sellés S., Casado-Vela J., Belchi-Navarro S. et Pedreno M.A. (2006). Modified cyclodextrins are chemically defines glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 65-71.
- Busam G., Kassemeyer H.H. et Matern U. (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology*, **115**, 1029-1038.
- Buschmann H., Fan Z-W. et Sauerborn J. (2005). Effect of resistance-inducing agents on sunflower (*Helianthus annuus* L.) and its infestation with the parasitic weed *Orobanche Cumana* Wallr. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **112**, 386-397.
- Buttrose M.S. (1969). Vegetative growth of grapevine varieties under controlled temperature and light-intensity. *Vitis*, **8**, 280-285.



- Caballerro-Mellado J., Martinez-Aguilar L., Paredes-Valdez G. et Estrada-de-los-Santos P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1165-1172.
- Cartieaux F., Thibaud M.C., Zimmerli L., Lessard P., Sarrobert C., David P., Gerbaud A., Robaglia C., Somerville S. et Nussaume L. (2003). Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal*, **36**, 177-188.
- Chadefaud M. et Emberger L. (1960). Les végétaux vasculaires. In: *Traité de Botanique*, vol 2, Masson, Paris, France, pp 1-1450.
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B., Hong X., Agarwal M. et Zhu J-K. (2009). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, **17**, 1043-1054.
- Chinnusamy V., Zhu J. et Zhu J.K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in Plant Science*, **12**, 444-451.
- Chinnusamy V., Schumaker K. et Zhu J-K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 225-236.
- Chisholm S.T., Coaker G., Day B. et Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Chong J., Poutaraud A. et Hugueney P. (2009). Metabolism and roles of stilbens in plants. *Plant Science*, **177**, 143-155.
- Choudhary D.K. et Johri B.N. (2009). Interaction of *bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, **164**, 493-513.
- Chung I-M., Park M.R., Chun J.C. et Yun S.J. (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, **164**, 103-109.
- Clough S.J., Fengler K.A., Yu I.C., Lippok B., Smith R.K. et Bent A.F. (2000). The *Arabidopsis dnd1* “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 9323-9328.
- Coenye T. et Vandamme P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, **5**, 719-729.
- Cohen Y.R. (2002). *B*-Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant Disease*, **86**, 448-457.
- Cohen Y., Gisi U. et Mosinger E. (1991). Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **38**, 255-263.
- Colcombet J. et Hirt H. (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological process. *Biochemistry Journal*, **413**, 217-226.
- Compant S., Clément C. et Sessitsch A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 669-678.
- Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowak J., Ait Barka E. et Clément C. (2008a). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology and Ecology*, **63**, 84-93.
- Compant S., Nowak J., Coenye T., Clément C. et Ait Barka E. (2008b). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**, 607-626.
- Compant S. (2007). Interaction entre la vigne, *Vitis vinifera* L., et une bactérie endophytique, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN : colonisation, induction de défenses et résistance systémique contre *Botrytis cinerea*. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, France, 184 pages.
- Compant S., Nowak J., Clément C. et Ait Barka E. (2007). Polyphenolic compound accumulation as a response of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to colonization by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: In *Macromolecules from grapevine and vine* (Jeandet P., Conreux A. and Clément C., eds), Lavoisier, Paris, France, p 89-93.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. et Ait Barka E. (2005a). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4951-4959.





- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C. et Ait Barka E. (2005b). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1685-1693.
- Conn V.M., Walker A.R. et Franco C.M.M. (2008). Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 244-259.
- Conrath U. (2009). Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, **51**, 361-395.
- Conrath U. et Göllner K. (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, **121**, 233-242.
- Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., Garcia-Agustin P., Jakab G., Mauch F., Newman M.-A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L. et Mauch-Mani B. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **19**, 1062-1071.
- Conrath U., Pieterse C.M.J. et Mauch-Mani B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, **7**, 210-216.
- Conrath U., Chen Z., Ricigliano J.R. et Klessig D.F. (1995). Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **92**, 7143-7147.
- Cools H.J. et Ishii H. (2002). Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **61**, 273-280.
- Cornelissen B.J. et Melchers L.S. (1993). Strategies for control of fungal disease with transgenic plant. *Plant Physiology*, **101**, 709-712.
- Cother E.J., Noble D., Peters B.J., Albiston A. et Ash G.J. (2004). A new bacterial disease of jojoba caused by *Burkholderia andropogonis*. *Plant Pathology*, **53**, 129-135.
- Coulomb C., Lizzi Y., Coulomb P.J., Roggero J.P. Coulomb P.O. et Agullon O. (1998). Can copper be an elicitor ? *Phytoma*, **512**, 41-46.
- Coutos-Thévenot P., Poinssot B., Bonomelli A., Yean H., Breda C., Buffard D., Esnault R., Hain R. et Boulay M. (2001). *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *VstI* gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 901-910.
- Cus F., Cesnik H.B., Bolta S.V. et Gregorcic A. (2010). Pesticides residues in grape and during vinification. *Food Control*, **21**, 1512-1518.
- Danon A., Rotari V.I., Gordon A., Mailhac N. et Gallois P. (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase Inhibitors, p35 and *Defender against Apoptotic Death*. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 779-787.
- Danon A. et Gallois P. (1998). UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **437**, 131-136.
- Darriet P., Poupot C., Armand J.M., Dubourdiou D., Clerjeau M., Glories Y., Bordeu E., Pszczolkowski P. et Bugaret Y. (2001). Incidence of vine sprayings with downy mildew fungicides, without parasitic fungi, on Cabernet Sauvignon grapes and wines composition. *International Journal of Vine and Wine Sciences*, **35**, 23-29.
- Darriet P., Pons M., Lamy S. et Dubourdiou D. (2000). Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 4835-4838.
- Davies D.R., Bindschedler L.V., Strickland T.S. et Bolwell G.P. (2006). Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 1817-1827.
- de Beer A. et Vivier M. (2008). Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *BMC Plant Biology*, **8**, 75.
- De Cal A., Sztejnberg A., Sabuquillo P. et Melgarejo P. (2009). Management *Fusarium* wilt on melon and watermelon by *Penicillium oxalicum*. *Biological Control*, **51**, 480-486.
- Delaney T.P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gur-Rella M., Kessmann H., Ward E. et Ryals J. (1994). A



- central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, **266**, 1247-1250.
- Delledonne M. (2005). NO is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 390-396.
- De Meyer G., Audenaert K. et Höfte M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on *in planta* salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *European Journal of Plant Pathology*, **105**, 513-517.
- Denef V. (2007). Biodegradation of organic anthropogenic pollutants by *Burkholderia* species. In: *Burkholderia, molecular microbiology and genomics* (Coenye T. and Vandamme P., eds), Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, pp 177-202.
- Derckel J.P., Legendre L., Audran J.C., Haye B. et Lambert B. (1998). Characterization, induction by wounding and salicylic acid and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum*, **104**, 56-64.
- Derckel J.P., Legendre L., Audran J.C., Haye B. et Lambert B. (1996). Chitinases of grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science*, **119**, 31-37.
- de Torres-Zabala M., Truman W., Bennett M.H., Lafforgue G., Mansfield J.W., Egea P.R., Bögre L. et Grant M. (2007). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscissic acid signaling pathway to cause disease. *The EMBO Journal*, **26**, 1434-1443.
- De Vleeschauwer D. et Höfte M. (2009). Rhizobacteria-Induced systemic Resistance. *Advances in Botanical Research*, **51**, 223-281.
- De Vleeschauwer D., Djavaheri M., Bakker P.A.H.M. et Höfte M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiology*, **148**, 1996-2012.
- Devoto A. et Turner J.G. (2003). Regulation of jasmonate-mediated plant responses in *Arabidopsis*. *Annals of Botany*, **92**, 329-337.
- Ding X., Cao Y., Huang L., Zhao J., Xu C., Li X. et Wang S. (2008). Activation of the indole-3-acetic acid-amino synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell*, **20**, 228-240.
- Doares S.H., Narváez-Vásquez J., Conconi A. et Ryan C.A. (1995). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiology*, **108**, 1741-1746.
- Domenech J., Ramos S.B., Probanza A., Lucas G.J.A. et Gutierrez M.F.J. (2007). Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotinana glauca*: a study of the putative induction pathway. *Plant Soil*, **294**, 43-50.
- Donaldson P.A., Anderson T., Lane B.G., Davidson A.L. et Simmonds D.H. (2001). Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **59**, 297-307.
- Dong X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 548-552.
- Donnez D., Jeandet P., Clément C. et Courot E. (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, **27**, 706-713.
- Doré C. et Varoquaux F. (2006). Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Collection Savoir Faire, INRA eds, Paris, pp. 812.
- Dorey S., Kopp M., Geoffroy P., Fritig B. et Kauffmann S. (1999). Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiology*, **121**, 163-171.
- Dubos B., Jailloux F. et Bulit J. (1982). Microbial antagonism in the control of grey mould of grapevine. *EPPO Bulletin*, **12**, 171-175.
- Dubos B., Bulit J., Bugaret Y. et Verdu D. (1978). The possibilities of using *Trichoderma viride* for the biological control of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola* on grapevines. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France*, **14**, 1159-1168.
- Dubreuil-Maurizi C., Trouvelot S., Frettinger P., Pugin A., Wendehenne D. et Poinssot B. (2010).  $\beta$ -aminobutyric acid primes an NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species production



- during grapevine-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **23**, 1012-1021.
- Duijff B.J., Pouhair D., Olivain C., Alabouvette C. et Lemanceau P. (1998). Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 903-910.
- Edreva A. (2005). Pathogenesis-related proteins : research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*, **31**, 105-124.
- Eibach R., Zyprian E., Welter L. et Töpfer R. (2007). The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis*, **46**, 120-124.
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. et Delen N. (2004). *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-9.
- Elmer P.A.G et Reglinski T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, **55**, 155-177.
- El-Tarabily K.A. et Sivasithamparam K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, **47**, 25-35.
- Estrada P., Mavingui P., Cournoyer B., Fontaine F., Balandreau J. et Cabalero-Mellado J. (2002). A N<sub>2</sub>-fixing endophytic *Burkholderia* spp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*, **48**, 285-294.
- Estrada-de-los-Santos E., Bustillo-Cristales R. et Cabalero-Mellado J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2790-2798.
- Fan C., Pu N., Wang X., Wang Y., Fang L., Xu W. et Zhang J. (2008). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **92**, 197-206.
- Faurie B., Cluzet S. et Méryllon J-M. (2009). Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, **166**, 1863-1877.
- Feechan A., Kwon E., Yun B-W., Wang Y., Pallas J.A. et Loake G.J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **102**, 8054-8059.
- Ferreira A., Quecine M.Q., Lacava P.T., Oda S., Azevedo J.L. et Aroujo W.L. (2008). Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiology Letters*, **287**, 8-14.
- Finch-Savage W.E. et Leubner-Metzger G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, **171**, 501-523.
- Flors V., Ton J., Jakab G. et Mauch-Mani B. (2008). Abscissic acid and callose: team players in defense against pathogens? *Journal of Phytopathology*, **153**, 1-7.
- Francks T.K., Powell K.S., Choimes S, Marsh E., Iocco P., Sinclair B.J., Ford C.M. et van Heeswijk R. (2006). Consequences of transferring three sorghum genes for secondary metabolite (cyanogenic glucoside) biosynthesis to grapevine hairy roots. *Transgenic Research*, **15**, 181-195.
- Frommel M.I., Nowak J. et Lazarovits G. (1993). Treatment of potato tubers with a growth promoting *Pseudomonas* sp.: plant growth responses and bacterium distribution in the rhizosphere. *Plant and Soil*, **150**, 51-60.
- Frommel M.I., Nowak J. et Lazarovits G. (1991). Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*, **96**, 928-936.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 436-442.
- Ganley R., Sniezko R.A. et Newcombe G. (2008). Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management*, **255**, 2751-2760.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinsot B., Wendehenne D. et Pugin A. (2006). Early signaling



- events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 711-724.
- Garcion C., Lamotte O. et Métraux J.P. (2007). Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Blackwell publishing, pp 109-132.
- Genger R.K., Jurkowski G.I., McDowell J.M., Lu H., Jung H.W., Greenberg J.T. et Bent A.F. (2008). Signaling pathways that regulate the enhanced disease resistance of *Arabidopsis* "defense, no death" mutants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1285-1296.
- Gerber I.B. et Dubery I.A. (2004). Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry*, **65**, 2957-2966.
- Gerber I.B., Zeidler D., Durner J. et Dubery I.A. (2004). Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta*, **218**, 647-657.
- Gerhardson B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, **20**, 338-343.
- Gianinazzi S., Martin C. et Vallée J.C. (1970). Hypersensibilité au virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Paris*, **270**, 2383-2386.
- Giannakis C., Bucheli C.S., Skene K.G.M., Robinson S.P. et Steele Scott N. (1998). Chitinase and beta-1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **4**, 14-22.
- Gilbert J., Jordan M., Somers D.J., Xing T. et Punja Z.K. (2006). Engineering plants for durable disease resistance. In: Multigenic and induced systemic resistance in plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United State of America, pp 225-258.
- Giorcelli A., Sparvoli F., Fulvio M.Y., Tava A., Balestrazzi A., Vrhovsek U., Calligari P., Bollini R. et Confalonieri M. (2004). Expression of the stilben synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant compounds resveratrol glucosides. *Transgenic Research*, **13**, 203-214.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review in Phytopathology*, **43**, 205-227.
- Glazebrook J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 301-308.
- Glick B.R., Penrose D. et Li J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, **190**, 63-68.
- Gomès E., Sagot E., Gaillard C., Laquitaine L., Poinssot B., Sanejouand Y.-H., Delrot S. et Coutos-Thévenot P. (2003). Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 456-464.
- Gonzalez C.F., Venturi V. et Engledow A.S. (2007). The phytopathogenic *Burkholderia*. In: *Burkholderia, molecular microbiology and genomics* (Coenye T. and Vandamme P., eds), Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, pp 153-176.
- Govrin E.M., Rachmilevitch S., Tiwari B.S., Solomon M. et Levine A. (2006). An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology*, **96**, 299-307.
- Govrin E.M. et Levine A. (2000). The hypersensitive reaction facilitates plant infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, **10**, 751-757.
- Grant M. et Lamb C. (2006). Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**, 414-420.
- Gray E.J. et Smith D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 395-412.
- Greenberg J.T., Guo A., Klessig D.F. et Ausubel F.M. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, **77**, 551-563.
- Griffith M. et Yaish M.W. (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, **9**, 399-405.
- Gus A.A., Brunner F. et Nürnberger T. (2010). Biotechnological concepts for improving plant





- innate immunity. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**, 1-7.
- Gyaneshwar P., James E.K., Mathan N., Reddy P.M., Reinhold-Hurek B. et Ladha J. (2001). Endophytic colonisation of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 2634-2645.
- Haas D. et Defago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 307-319.
- Haas D. et Keel C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review in Phytopathology*, **41**, 117-153.
- Hain R., Reif H.J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stocker R.H. et Stenzel K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, **361**, 153-156.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F. et Klopper J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 895-914.
- Hamiduzaman M.M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J.-M. et Mauch-Mani B. (2005). *B*-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signalling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 819-829.
- Haridom P.R., van Overbeek L.S. et van Elsas J.D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, **6**, 463-471.
- Harish S., Kavino M., Kumar N., Balasubramanian P. et Samiyappan R. (2009). Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*. *Biological Control*, **51**, 16-25.
- Harman G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, **96**, 190-194.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I. et Lorito M. (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews in Microbiology*, **2**, 43-56.
- Harman G.E., Latorre B., Agosin E., San Martin R., Riegel D.G., Nielsen P.A., Tronsmo A. et Pearson R.C. (1996). Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological Control*, **7**, 259-266.
- Hase S., Takahashi S., Takenaka S., Nakaho K., Arie T., Seo S., Ohashi Y. et Takahashi H. (2008). Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology*, **57**, 870-876.
- Hawkins S. et Boudet S. (2003). 'Defense lignin' and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii*. *Forest Pathology*, **33**, 91-104.
- He R.-L., Wang G.-P., Liu X.-H., Zhang C.-L. et Lin F.-C. (2009). Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. *African Journal of Biotechnology*, **8**, 191-195.
- He P., Shan L., Lin N.C., Martin G.B., Kemmerling B., Nürnberger T. et Sheen J. (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell*, **152**, 563-575.
- He C.Y. et Wolyn D.J. (2005). Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*. *Plant Pathology*, **54**, 227-232.
- Hebbar P., Davey A.G., Merrin J., McLoughlin T.J. et Dart P.J. (1992). *Pseudomonas cepacia*, a potential suppressor of maize soil borne diseases: seed inoculation and maize root colonization. *Soil Biology and Biochemistry*, **24**, 999-1007.
- Heck S., Grau T., Buchala A., Métraux J.-P. et Nawrath C. (2003). Genetic evidence that expression of *NahG* modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *The Plant Journal*, **36**, 342-352.
- Heil M. et Walters D.R. (2009). Ecological consequences of plant defense signalling. *Advances in Botanical Research*, **51**, 667-716.
- Heitefuss R. (2001). Defense reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften*, **88**, 273-283.
- Hellman E.W. (2003). Grapevine structure and function. In: Oregon viticulture (Hellman E.W., ed), Corvallis: Oregon State University Press, United States of America, pp 5-19.



- Hématy K., Cherk C. et Somerville S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 406-413.
- Hendrickson L., Ball M.C., Wood J.T., Chow W.S. et Furbank R.T. (2004). Low temperature effects on photosynthesis and growth of grapevine. *Plant Cell and Environment*, **27**, 795-809.
- Hendrickson L., Ball M.C., Osmond C.B., Furbank R.T. et Chow W.S. (2003). Assessment of photoprotection mechanisms of grapevines at low temperature. *Functional Plant Biology*, **30**, 631-642.
- Hernandez-Blanco C., Feng D.X., Hu J., Sánchez-Vallet A., Deslandes L., Llorente F., Berrocal-Lobo M., Keller H., Barlet X., Sánchez-Rodríguez C., Anderson L.K., Somerville S., Yves Marco Y. et Molina A. (2007). Impairment of cellulose synthase required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell*, **19**, 890-903.
- Hirasawa K-I., Amano T. et Shioi Y. (2005). Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by crytoein. *Phytochemistry*, **66**, 463-468.
- Hoffland E., Pieterse C.M.J., Bik L. et Van Pelt J.A. (1995). Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **46**, 309-320.
- Hoffman T., Schmidt J.S., Zheng X. et Bent A.F. (1999). Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology*, **119**, 935-949.
- Hoitink H.A.J., Madden L.V. et Dorrance A.E. (2006). Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.; interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent and soil organic matter quality. *Phytopathology*, **96**, 186-189.
- Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A., Kwok Y.C. et Yang D.S. (1995). Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology*, **109**, 879-889.
- Hong J.K., Yu B-W., Kang J-G., Raja M.U., Kwon E., Sorhagen K., Chu C., Wang Y. et Loake G.J. (2008). Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 147-154.
- Hu X., Bidney D.L., Yalpani N., Duvick J.P., Castra O., Folkerts O. et Lu G. (2003). Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*, **133**, 170-181.
- Hu X. et Reddy A.S.N. (1997). Cloning and expression of a PR-5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology*, **34**, 949-959.
- Huang T. et Duman J.G. (2002). Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Molecular Biology*, **48**, 339-350.
- Huglin P. et Schneider C. (1998). In : Biologie et écologie de la vigne, Tec & Doc Lavoisier (ed), Paris, France, 370 pages.
- Iavicoli A., Boutet E., Buchala A. et Métraux J.P. (2003). Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 851-858.
- Iniguez A.L., Dong Y., Carter H.D., Ahmer B.M.M., Stone J.M. et Triplett E.W. (2005). Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 169-178.
- Jabs T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology*, **57**, 231-245.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepand C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Hugueney P., Dasilva C., Horner D., Mica E., Jublot D., Poulain J., Bruyère C., Billault A., Ségurens B., Gouyvenoux M., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chateland P., Merdinoglou D., Delledonne M., Pezzotti M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F. et Wincker P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, **449**, 463-467.
- Jalloul A., Clerivet A. et Nicole M. (2009). La signalisation hormonale dans la résistance des plantes aux bioagresseurs. *Cahiers Agricultures*, **18**, 493-497.



- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. et Adrian M. (2002). Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2731-2741.
- Jones J.D.G. et Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Jourdan E., Ongena M. et Thonart P. (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **12**, 437-449.
- Jurkowski G.I., Smith Jr R.K., Yu I.C., Ham J.H., Sharma S.B., Klessig D.F., Fengler K.A. et Bent A.F. (2004). *Arabidopsis* DND2, a second cyclic nucleotide-gated ion channel gene for which mutation causes the "defense, no death" phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 511-520.
- Kachroo P., Yoshioka K., Shah J., Dooner K.D. et Klessig D.F. (2000). Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *The Plant Cell*, **12**, 677-690.
- Kang B.R., Yang K.Y., Cho B.H., Han T.H., Kim I.S., Lee M.C., Anderson A.J. et Kim Y.C. (2006). Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Current Microbiology*, **52**, 473-476.
- Katz V.A., Thulke O.U. et Conrath U. (1998). A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiology*, **117**, 1333-1339.
- Kauffmann S., Dorey S. et Baillieux F. (2009). Vers une stratégie alternative de protection des cultures. *Biofutur*, **296**, 26-30.
- Kazan K. et Manners J.M. (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, **14**, 373-382.
- Keith L., Sewake K. et Zee F. (2005). Isolation and characterization of *Burkholderia gladioli* from Orchids in Hawaii. *Plant Disease*, **89**, 1273-1278.
- Keller M., Viret O. et Cole F.M. (2003). *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology*, **93**, 316-322.
- Kempema L.A., Cui X., Holzer F.M. et Walling L.L. (2007). *Arabidopsis* transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. *Plant Physiology*, **143**, 849-865.
- Kikkert J., Ali G.S., Striem M.J., Martens M., Wallace P.G., Molini L. et Reisch B.I. (1997). Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp.) for enhancement of disease resistance. *Acta Horticulturae*, **447**, 273-279.
- Kim B.S., Moon S.S. et Hwang B.K. (1999). Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Canadian Journal of Botany*, **77**, 850-858.
- Klarzinski O., Plesse B., Joubert J.M., Yin J.C., Kopp M., Kloareg B. et Fritig B. (2000). Linear  $\beta$ -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, **124**, 1027-1037.
- Kloepper J.W., Rodriguez-Ubana R., Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E. et Fernandez C. (1999). Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, **28**, 21-26.
- Knight H. et Knight M.R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, **6**, 262-267.
- Knoester M., Pieterse C.M.J., Bol J.F. et van Loon L.C. (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signalling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 720-727.
- Knoester M., van Loon L.C., Van den Heuvel J., Hennig J., Bol J.F. et Linthorst H.J.M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **95**, 1933-1937.
- Kobayashi S., Ding C.K., Nakamura Y., Nakajima I. et Matsumoto R. (2000). Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Reports*, **19**, 904-910.
- Kokalis-Burelle N., Mahaffee W.F., Rodriguez-Kabana R., Kloepper J.W. et Bowen K.L. (2002). Effects of Switchgrass (*Panicum virgatum*) rotations with peanuts (*Arachis hypogaea*) on nematode population and soil microflora. *Journal of Nematology*, **34**, 98-105.



- Komarek M., Cadkova E., Chrastny V., Bordas F. et Bollinger J-C. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspect. *Environment International*, **36**, 138-151.
- Kortekamp A. (2006). Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**, 58-67.
- Krishna P. (2003). Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, **22**, 289-297.
- Kumar S., Pandey P. et Maheshwari D.K. (2009). Reduction in dose of chemical fertilizers and growth enhancement of sesame (*Sesamum indicum* L.) with application of rhizospheric competent *Pseudomonas aeruginosa* LES4. *European Journal of Soil Biology*, **45**, 334-340.
- Kunkel B.N. et Brooks D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defence. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 325-331.
- Kuppusamy K.T., Walcher C.L. et Nemhauser J.L. (2009). Cross-regulatory mechanisms in hormone signalling. *Plant Molecular Biology*, **69**, 375-381.
- Lagrimini L.M., Burkhart W., Moyer M. et Rothstein S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **84**, 7542-7546.
- Langcake P. et Pryce R.J. (1977). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, **16**, 1193-1196.
- Lange B.M., Lapierre C. et Sandermann Jr H. (1995). Elicitor-induced spruce stress lignin (structural similarity to early developmental lignins). *Plant Physiology*, **108**, 1277-1287.
- Laquitaine L., Gomès E., François J., Marchive C., Pascal S., Hamdi S., Atanassova R., Delrot S. et Coutos-Thévenot P. (2006). Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: induction of type I *LTP* promoter activity, *WRKY*, and stilbene synthase gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 1103-1112.
- Larignon P., Fontaine F., Farine S., Clément C. et Bertsch C. (2009). Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus Biologies*, **332**, 765-783.
- Latorre B.A., Agosin E., San Martin R. et Vasquez G.S. (1997). Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*, **16**, 209-214.
- Latunde-Dada A.O. et Lucas J.A. (2001). The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **58**, 199-208.
- Leadbeater A. et Staub T. (2007). Exploitation of induced resistance: a commercial perspective. In: Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Balckwell publishing, pp 229-242.
- Lecourieux D., Mazars C., Pauly N., Ranjeva R. et Pugin A. (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *The Plant Cell*, **14**, 2627-2641.
- Le Hénanff G. (2009). Caractérisation fonctionnelle de genes de signalisation intervenant dans les réponses de défense aux agents pathogènes chez la vigne. Thèse de l'Université de Haute-Alsace, France, 164 pages.
- Lemanceau P., Expert D., Gaymard F., Bakker P.A.H.M. et Briat J-F. (2009). Role of iron in plant-microbe interactions. *Advances in Botanical Research*, **51**, 491-549.
- Leroux P. (2003). Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus de Biologie*, **326**, 9-21.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. et Lamb C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593.
- Li Z., Wakao S., Fischer B.B. et Niyogi K.K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 239-260.
- Li J., Brader G. et Palva E.T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell*, **16**, 319-331.
- Ligterink W., Kroj T., Zur Nieden U., Hirt H. et Scheel D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, **276**, 2054-2057.





- Lin T.P., Chen C.L., Fu H.C., Wu C.Y., Lin G.H., Huang S.H., Chang L.K. et Liu S.T. (2005). Functional analysis of fengycin synthetase FenD. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression*, **1730**, 159-164.
- Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C.D. et Harrison M.J. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal*, **50**, 529-544.
- Llorente F., Muskett P., Sanchez-Vallet A., Lopez G., Ramos B., Sanchez-Rodriguez C., Jorda L., Parker J. et Molina A. (2008). Repression of the auxin response pathway increases *Arabidopsis* susceptibility to necrotrophic fungi. *Molecular Plant*, **1**, 496-509.
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M. et van der Lelie D. (2002). Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**, 583-606.
- Lopez M.A., Bannenberg G. et Castresana C. (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 1-8.
- Lo Piccolo S., Ferraro V., Alfonzo A., Settanni L., Ercolini D., Burrano S. et Moschetti G. (2010). Presence of endophytic bacteria in *Vitis vinifera* leaves as detected by fluorescence in situ hybridization. *Annals of Microbiology*, **60**, 161-167.
- Loqman S., Ait Barka E., Clément C. et Ouhdouch Y. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 81-91.
- Lorito M., Broadway R.M., Hayes C.K., Woo S.L., Noviello C., Williams D.L. et Harman G.E. (1994). Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**, 525-527.
- Lugtenberg B.J.J., Dekkers L. et Bloemberg G.V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, **39**, 461-490.
- Lyon G. (2007). Agents that can elicit induced resistance. In: *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Balckwell publishing, pp 9-29.
- Mackey D. et McFall A.J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology*, **61**, 1365-1371.
- Magnani G.S., Didonet C.M., Cruz L.M., Picheth C.F., Pedrosa F.O. et Souza E.M. (2010). Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and Molecular Research*, **9**, 250-258.
- Magnin-Robert M., Trotel-Aziz P., Quantinet D., Biagiatti S. et Aziz A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, **118**, 43-57.
- Mahajan S. et Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **444**, 139-158.
- Mahenthiralingam E. et Drevinek P. (2007). Comparative genomics of *Burkholderia* species. In: *Burkholderia, molecular microbiology and genomics* (Coenye T. and Vandamme P., eds), Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, pp 53-80.
- Marchal R., Tabary I., Valade M., Moncomble D., Viaux L., Robillard B., Duteubre B. et Jeandet P. (2002). Influence de la pourriture grise sur les propriétés moussantes des champagnes. *Le vigneron champenois*, **6**, 52-64.
- Mastretta C., Taghavi S., van der Lelie D., Mengoni A., Galardi F., Gonnelli C., Barac T., Boulet J., Weyens N. et Vangronsveld J. (2009). Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *International Journal of Phytoremediation*, **11**, 251-267.
- Mauch-Mani B. et Mauch F. (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 409-414.
- Maurhofer M., Hase C., Meuwly P., Métraux J-P. et Defago G. (1994). Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and pyoverdine production. *Phytopathology*, **84**, 139-146.
- McDowell J.M. et Dangl J.L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 79-82.
- McLusky S.R., Bennett M.H., Beale M.H., Lewis M.J., Gaskin P. et Mansfield J.W. (1999). Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of



- attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, **17**, 523-534.
- Meier U. (2001). Grapevine. In Meier U. (Ed), Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH monograph: Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Blackwell Wissenschafts-verlag, Berlin, Allemagne, pp 93-95.
- Mejia L.C., Rojas E.I., Maynard Z., Van Bael S., Arnold A.E., Hebban P., Samuels G.J., Robbins N. et Herre E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, **46**, 4-14.
- Mellersh D.G. et Heath M.C. (2003). An investigation into the involvement of defense signaling pathways in components of the nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 398-404.
- Melotto M., Underwood W., Kozczan J., Nomura K. et He S.Y. (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, **126**, 969-980.
- Ménard R., Alban S., de Ruffray P., Jamois F., Franz G., Fritig B., Yvin J-C. et Kauffmann S. (2004).  $\beta$ -1,3 glucan sulfate, but not  $\beta$ -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **16**, 3020-3032.
- Mendes R., Pizzirani-Kleiner A.A., Araujo W.L. et Raaijmakers J.M. (2007). Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 7259-7267.
- Mercado-Blanco J. et Bakker P.A.H.M. (2007). Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek*, **92**, 367-389.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. et van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, **9**, 490-498.
- Miyagawa H. (2000). Biocontrol of bacterial seedling blight of rice caused by *Burkholderia gladioli* using with its avirulent isolate. *Japan Journal of Phytopathology*, **66**, 232-238.
- Monteiro S., Barakat M., Piçarra-Pereira M.A., Teixeira A.R. et Ferreira R.B. (2003). Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, **93**, 1505-1512.
- Morgan J.A.W., Bending G.D. et White P.J. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1729-1739.
- Morrissey J.P., Dow J.M., Mark G.L. et O'Gara F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production? *EMBO Reports*, **5**, 922-926.
- Muessig C., Lisso J., Coll-Garcia D. et Altmann T. (2006). Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biology*, **8**, 291-296.
- Muller B. et Sheen J. (2007). Advances in cytokinin signalling. *Science*, **318**, 68-69.
- Munkvold G.P. et Marois J.J. (1993). Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa dieback*. *Phytopathology*, **83**, 624-629.
- Mur L.A., Kenton P., Atzorn R., Miersch O. et Wasternack C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology*, **140**, 249-262.
- Mur L.A.J., Naylor G., Warner S.A.J., Sugars J.M., White R.F. et Draper J. (1996). Salicylic acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal*, **9**, 559-571.
- Muthukumarasamy R., Kang U.G., Park K.D., Jeon W.-T., Park C.Y., Cho Y.S., Kwon S.-W., Song J., Roh D.-H. et Revathi G. (2007). Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 981-991.
- Nakashita H., Yasuda M., Nitta T., Asami T., Fujioka S., Arai Y., Sekimata K., Takatsuto S., Yamaguchi I. et Yoshida S. (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *The Plant Journal*, **33**, 887-898.
- Nakayama T., Homma Y., Hashidoko Y., Mizutani J. et Tahara S. (1999). Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet



- damping-off disease. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4334-4339.
- Navarro L., Bari R., Achard P., Lison P., Nemri A., Harberd N.P. et Jones J.D. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signalling. *Current Biology*, **18**, 650-655.
- Nawrath C. et Métraux J.P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell*, **11**, 1393-1404.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. et Hancock J.T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 372, 1237-1247.
- Niderman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B. et Mössinger E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal – Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, **108**, 17-27.
- Nombela G., Pascual S., Aviles M., Guillard E. et Muniz M. (2005). Benzothiadiazole induces local resistance to *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) in tomato plants. *Journal of Economic Entomology*, **98**, 2266-2271.
- Norman-Setterblad C., Vidal S. et Palva T.E. (2000). Interacting signal pathway control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 430-438.
- Nowak J. (1998). Benefits of *in vitro* “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **34**, 122-130.
- Nowak J. et Shulaev V. (2003). Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plantarum*, **39**, 107-124.
- Nürnberg T. et Kemmerling B. (2009). PAMP-Triggered basal immunity in plants. *Advances in Botanical Research*, **51**, 1-38.
- Nürnberg T., Nennstiel D., Jabs T., Sacks W.R., Hahlbrock K. et Scheel D. (1994). High affinity bindings of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, **78**, 449-460.
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J-L. et Thonart P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, **9**, 1084-1090.
- Ongena M., Duby F., Jourdan E., Beaudry T., Jadin V., Dommes J. et Thonart P. (2005a). *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**, 692-698.
- Ongena M., Jacques P., Toure Y., Destain J., Jabrana A. et Thonart P. (2005b). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**, 29-38.
- Panter S. et Jones D. (2002). Age-related resistance to plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, **38**, 251-280.
- Papanov I., Papanov M., Teeale W., Menges M., Chkrabortee S., Muray J. et Palme K. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, **1**, 321-337.
- Paparu P., Dubois T., Coyne D. et Viljoen A. (2007). Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **71**, 149-157.
- Park S.W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S. et Klessig D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, **318**, 113-116.
- Parke J.L. et Gurian-Sherman D. (2001). Diversity of *Burkholderia cepacia* complex and its implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, **39**, 225-258.
- Partida-Martinez L.P. et Hertweck C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, **437**, 884-888.
- Paul B., Chereyathmanjiyil A., Masih I., Chapuis L. et Benoit A. (1998). Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of grapevine and



- elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, **165**, 65-70.
- Paul B., Girard I., Bhatnagar T. et Bouchet P. (1997). Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a soil bacterium. *Microbiological Research*, **152**, 413-420.
- Pedley K.F. et Martin G.B. (2005). Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 541-547.
- Penninckx I.A., Thomma B.P., Buchala A., Métraux J.P. et Broekaert W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathway is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 2103-2113.
- Persello-Cartieaux F., Nussaume L. et Robaglia C. (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell and Environment*, **26**, 189-199.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B. et Mundy J. (2000). *Arabidopsis* MAP Kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, **103**, 1111-1120.
- Petit A.-N. (2008). Effets de fongicides anti-*Botrytis* sur les organes végétatifs et reproducteurs de la vigne, Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France, 129 pages.
- Peypoux F., Bonmatin J.M. et Wallach J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**, 553-563.
- Pezet R., Viret O. et Gindro K. (2004). Plant-microbe interaction: the *Botrytis* grey mould of grapes-biology, biochemistry, epidemiology and control management. In: *Advances in Plant Physiology* (Hemantaranjan A., ed), Scientific publishers, Jodhpur, India, 7, 71-116.
- Pieterse C.M.J. et van Loon L.C. (2007). Signalling cascade involved in induced resistance. In: *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*, (Walters D., Newton A; and Lyon G. eds), Blackwell Publishing, pp 65-88.
- Pieterse C.M.J., Van Pelt J.A., Ton J., Parchmann S., Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J.-P. et van Loon L.C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **57**, 123-134.
- Pieterse C.M.J. et van Loon L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, **4**, 52-58.
- Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Van Pelt J.A., Knoester M., Laan R., Gerrits H., Weisbeek P.J. et van Loon L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1571-1580.
- Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Hoffland E., Van Pelt J.A. et van Loon L.C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, **8**, 1225-1237.
- Pillay V.K. et Nowak J. (1997). Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 354-361.
- Ping L. et Boland W. (2004). Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, **9**, 263-266.
- Pitzschke A., Schikora A. et Heribert H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 421-426.
- Planchon J.E. (1887). Monographie des Ampélidées vraies. *Monographia Phanerogamerum*, **5**, 305-364.
- Poinssot B., Vandelle E., Bentéjac M., Adrian M., Levis C., Brygoo Y., Garin J., Sicilia F., Coutos-Thévenot P. et Pugin A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 553-654.
- Postel S. et Kemmerling B. (2009). Plants systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **20**, 1025-1031.
- Pozo M.J., Van der Ent S., van Loon L.C. et Pieterse C.M.J. (2008). Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during





- rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, **180**, 511-523.
- Prats E., Rubiales D. et Jorin J. (2002). Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia helianthi*) is associated with enhancement of coumarins on foliar surface. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **60**, 155-162.
- Punja Z.K. (2001). Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **23**, 216-235.
- Quadt-Hallmann A., Benhamou N. et Kloepper J.W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 577-582.
- Raaijmakers J.M., Leeman M., Van Oorschot M.M.P., van der Sluis I., Schippers B. et Bakker P.A.H.M. (1995). Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, **85**, 1075-1081.
- Rabea E., Badawy M., Stevens C., Smaghe G. et Steubaut W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, **6**, 1457-1465.
- Radhakrishnan N. et Balasubramanian R. (2009). Salicylic acid induced defence responses in *Curcuma longa* (L.) against *Pythium aphanidermatum* infection. *Crop Protection*, **28**, 974-979.
- Rahman M.S., Ano T. et Shoda M. (2007). Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biotechnology*, **127**, 503-507.
- Rathjen J.P. et Moffett P. (2003). Early signal transduction events in specific plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 300-306.
- Reisch B.I., Kikkert J.R., Vidal J.R., Ali G.S., Gadoury D., Seem R. et Wallace P. (2003). Genetic transformation of *Vitis vinifera* to improve resistance. *Acta Horticulturae*, **603**, 303-308.
- Renault A.S. (1998). Induction de protéines de « défense » dans les feuilles de vigne infectées par *Botrytis cinerea* : identification d'une bêta-1, 3-glucanase (PR2) et étude de son expression spatio-temporelle. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, France, 185 pages.
- Renault A.S., Deloire A. et Bierne J. (1996). Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *B. cinerea*. *Vitis*, **35**, 49-52.
- Rensing S.A. (2010). The response of *Physcomitrella* to UV-B. *Plant Physiology*, doi : 10.1104/pp.110.154658.
- Repka V., Fischerova I. et Silharova K. (2004). Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum*, **48**, 273-283.
- Repka V. (2001). Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biologia Plantarum*, **44**, 555-565.
- Repka V., Kubikova J. et Fischerova I. (2000). Immunodetection of PR-1-like proteins in grapevine leaves infected with *Oidium tuckeri* and in elicited suspension cell cultures. *Vitis*, **39**, 123-127.
- Reuveni R. et Reuveni M. (1998). Foliar-fertilizer therapy – a concept in integrated pest management. *Crop Protection*, **17**, 111-118.
- Reynier A. (2003). Manuel de viticulture, 9<sup>ème</sup> édition. TEC & DOC, Paris, France, 554p.
- Rijavec T., Lapanje A., Dermastia M. et Rupnik M. (2007). Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal of Microbiology*, **53**, 802-808.
- Robert N., Roche K., Lebeau Y., Breda C., Boulay M., Esnault R. et Buffard D. (2002). Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science*, **162**, 389-400.
- Robert N. (2001). La Vigne et ses pathogènes : Isolement et expression de gènes codant pour différentes «Pathogenesis-related» protéines et leur utilisation pour une amélioration, par transgénèse, de ses capacités de défense. Thèse de l'Université de Paris 06, France, 250 pages.
- Robert-Seilaniantz A., Navarro L., Bari R. et Jones J.D.G. (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 372-379.
- Rodriguez M.C.S., Petersen M. et Mundy J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 621-649.
- Rodriguez-Navarro D.N., Dardanelli M.S. et Ruiz-Sainz J.E. (2007). Attachment of bacteria to the



- roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters* **272**, 127-136.
- Rosas S.B., Avanzini G., Carlier E., Paluosta C., Pastor N. et Rovera M. (2009). Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 1802-1806.
- Rosenblueth M. et Martinez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 827-837.
- Rudrappa T., Czymmek K.J., Pare P.W. et Bais H.P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, **148**, 1547-1556.
- Ruelland E., Vaultier M-N., Zachowski A. et Hurry V. (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research*, **49**, 39-150.
- Ruess W., Mueller K., Knauf-Beiter G. et Staub T. (1996). Plant activator CGA-245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. In: Brighton Crop Protection Conference-Pest and Diseases, pp 53-60.
- Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y. et Hunt M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, **8**, 1809-1819.
- Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J. et Dowling D.N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, **278**, 1-9.
- Ryu C.M., Murphy J.F., Mysore K.S. et Kloepper J.W. (2004). Plant-growth promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signalling pathway. *The Plant Journal*, **39**, 381-392.
- Ryu C.M., Hu C.H., Reddy M.S. et Kloepper J.W. (2003). Different signalling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathogens of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*, **160**, 413-420.
- Salles J.F., van Elsas J.D. et van Veen J.A. (2006). Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. *Microbial Ecology*, **52**, 267-269.
- Salzman R.A., Tikhonova I., Bordelon B.P., Hasegawa P.M. et Bressan R.A. (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology*, **117**, 465-472.
- Schenk P.M., Kazan K., Wilson I., Jonathan P. Anderson J.P., Todd Richmond T., Somerville S.C. et Manners J.M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarrays analysis. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, **97**, 655-660.
- Schnee S., Viret O. et Gindro K. (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **72**, 128-133.
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A-K. et Krohn K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, **106**, 996-1004.
- Segarra G., Van der Ent S., Trillas I. et Pieterse C.M.J. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology*, **11**, 90-96.
- Sels J., Mathys J., De Coninck M.A., Cammue B.P.A. et De Bolle M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 941-950.
- Seo H.S. Song J.T., Cheong J.J., Lee Y.H., Lee Y.W., Hwang I., Lee J.S. et Choi Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, **98**, 4788-4793.
- Sesan T.E., Oprea M., Podoscu Cristescu A., Tica C. et Oanecea F. (1999). Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. *Bulletin of the Polish Academy of Biological Sciences*, **47**, 197-205.
- Sessitsch A., Coenye T., Sturz A.V., Vandamme P., Ait Barka E., Salles J.F., Van Elsas J.D., Faure D., Reiter B., Glick B.R., Wang-Pruski G. et Nowak J. (2005). *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1187-1192.
- Shah J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 459-464.



- Shah J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 365-371.
- Sharathchandra R.G., Niranjana Raj S., Shetty N.P., Amruthes K.N. et Shekar Shetty H. (2004). A chitosan formulation Elexa™ induces mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection*, **23**, 881-888.
- Sharma V.K. et Nowak J. (1998). Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology*, **44**, 528-536.
- Shirasu K., Nakajima H., Rajasekhar K. et Dixon R.A. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell*, **9**, 261-270.
- Shoda M. (2000). Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **89**, 515-521.
- Shoebitz M., Ribaud C.M., Pardo M.A., Cantore M.L., Ciampi L. et Cura J.A. (2009). Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **41**, 1768-1774.
- Shoresh M., Yedidia I. et Chet I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signalling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, **95**, 76-84.
- Siddiqui Y. et Meon S. (2009). Effect of seed bacterization on plant growth response and induction of disease resistance in chilli. *Agricultural Sciences in China*, **8**, 963-971.
- Siddiqui Z.A. (2005). PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In PGPR: biocontrol and biofertilization (Z.A Siddiqui ed), Springer, The Netherlands, pp 111-142.
- Siemens J., Keller I., Sarx J., Kunz S., Schuller A., Nagel W., Schmülling T., Parniske M. et Müller L. (2006). Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 480-494.
- Slaughter R., Mauch-Mani B., Marouf E., Gindro K. et Neuhaus J-M. (2009). Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine. What's up in viticulture ? COST 858 Viticulture final meeting, Bordeaux, October 27-30, 2009, p50.
- Slaughter R., Hamiduzaman M.M., Gindro K., Neuhaus J-M. et Mauch-Mani B. (2008). Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology*, **122**, 185-195.
- Soylu E.M., Soylu S. et Mansfield J.W. (2004). Ultrastructural characterisation of pathogen development and host responses during compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Peronospora parasitica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**, 67-78.
- Soylu S., Keshavarzi M., Brown I. et Mansfield J.W. (2003). Ultrastructural characterisation of interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Albugo candida*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **63**, 201-211.
- Spaepen S., Vanderleyden J. et Okon Y. (2009). Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research*, **51**, 283-320.
- Spaepen S., Vanderleyden J. et Remans R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, **31**, 425-448.
- Spoel S.H., Johnson J.S. et Dong X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different life-styles. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, **104**, 18842-18847.
- Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M.C., Korzelius J.P., Van Pelt J.A., Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J-P., Brown R., Kazan K., van Loon L.C., Dong X. et Pieterse C.M.J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, **15**, 760-770.
- Stange Jr R.R., Ralph J., Peng J.P., Sims J.J., Midland S.L. et McDonald R.E. (2001). Acidolysis and hot water extraction provide new insights into the composition of the induced 'lignin'like material from squash fruit. *Phytochemistry*, **57**, 1005-1011.
- Staswick P.E., Yuen G.Y. et Lehman C.C. (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *The Plant Journal*, **15**, 747-754.



- Stein E., Molitor A., Kogel K.H. et Waller F. (2008). Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signalling and cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiology*, **49**, 1747-1751.
- Stepanova A.N. et Alonso J.M. (2005). Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiologia Plantarum*, **123**, 195-206.
- Stirpe F., Barbieri L., Battelli M.G., Soria M. et Lappi D.A. (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology*, **10**, 405-412.
- Sturz A.V. et Christie B.R. (2003). Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and tillage research*, **72**, 107-123.
- Sturz A.V. et Nowak J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied and Soil Ecology*, **15**, 183-190.
- Sun Y., Cheng Z. et Glick B.R. (2009). The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiology Letters*, **296**, 131-136.
- Suryanarayanan T.S., Thirunavukkarasu N., Govindarajulu M.B., Sasse F., Jansen R. et Murali T.S. (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, **23**, 9-19.
- Taheri P. et Tarighi S. (2009). Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 201-208.
- Tang K., Zhan J-C., Yang H-R. et Huang W-D. (2010). Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 95-102.
- Tassoni A., Fornale S., Franceschetti M., Musiani F., Michael A.J., Perry B. et Bagni N. (2005). Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist*, **166**, 895-905.
- Tattersall D.B., van Heeswijk R. et Hoj P.B. (1997). Identification and characterization of a fruitspecific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology*, **114**, 759-769.
- Theocharis A. (2010). Physiological responses of *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN colonized plantlets of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to low non-freezing temperatures. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, 226 pages.
- Thomas P. (2006). Isolation of an ethanol-tolerant endospore-forming gram-negative *Brevibacillus* sp. as a covert contaminant in grape tissue cultures. *Journal of Applied Microbiology*, **101**, 764-774.
- Thomas P. (2004). Isolation of *Bacillus pumilus* from *in vitro* grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 114-123.
- Thomashow M.F. (1999). Plant cold acclimation, freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 571-599.
- Thomma B.P.H.J., Penninckx I.A.M.A., Broekaert W.F. et Cammue B.P.A. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology*, **13**, 63-68.
- Thomma B.P.H.J., Eggermont K., Tierens K.F.M. et Broekaert W.F. (1999a). Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, **121**, 1093-1102.
- Thomma B.P.H.J., Nelissen I., Eggermont K. et Broekaert W.F. (1999b). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal*, **19**, 163-171.
- Thomma B.P.H.J., Eggermont K., Penninckx I.A.M.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A. et Broekaert W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceeding of The National Academy of Sciences USA*, **95**, 15107-15111.
- Thulke O.U. et Conrath U. (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *The Plant Journal*, **14**, 35-42.
- Timmusk S. et Wagner E.G.H. (1999). The plant-growth-promoting-rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana*





gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 951-959.

Tjamos S.E., Flemetakis E., Paplomatas E.J. et Katinakis P. (2005). Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 555-561.

Ton J., Flors V. et Mauch-Mani B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, **14**, 310-317.

Ton J., Jakab G., Toquin V., Flors V., Iavicoli A., Maeder M.N., Métraux J.P. et Mauch-Mani B. (2005). Dissecting the  $\beta$ -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **17**, 987-999.

Ton J. et Mauch-Mani B. (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, **38**, 119-130.

Ton J., De Vos M., Robben C., Buchala A., Métraux J.P., van Loon L.C. et Pieterse C.M.J. (2002). Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *The Plant Journal*, **29**, 11-21.

Torres M.A., Jones J.D.G. et Dangl J.L. (2006). Reactive oxygen species signalling in response to pathogens. *Plant Physiology*, **141**, 373-378.

Tran Van V., Berge O., Balandreau J., Ngo Kê S. et Heulin T. (1996). Isolement et activité nitrogénasique de *Burkholderia vietnamiensis*, bactérie fixatrice d'azote associée au riz (*Oryza sativa* L) cultivé sur un sol sulfate acide du Viêt Nam. *Agronomie*, **16**, 479-491.

Tran Van V., Mavingui P., Berge O., Balandreau J. et Heulin T. (1994). Promotion de croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*, isolée d'un sol sulfate acide du Viêt Nam. *Agronomie*, **14**, 697-707.

Trotel-Aziz P., Couderchet M., Vernet G. et Aziz A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **114**, 405-413.

Trotel-Aziz P., Aziz A., Amborabe E., Kilani-Feki O. et Vernet G. (2003). Biological control of *Botrytis cinerea* in vineyards (*Vitis vinifera* L.): evaluation of native endophytic bacteria of the

Champagne Ardenne region. *Le Progrès Agricole et Viticole*, **120**, 279-280.

Trouvelot S., Varnier A-L., Allègre M., Mercier L., Baillieu F., Arnould C., Gianinazzi-Pearson V., Klarynski O., Joubert J-M., Pugin A. et Daire X. (2008). A  $\beta$ -1, 3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 232-243.

Truman W., Bennett M.H., Kubigsteltig I., Turnbull C. et Grant M. (2007). *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signalling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, **104**, 1075-1080.

Turner J.G., Ellis C. et Devoto A. (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*, **14**, 153-164.

Tuzun S. et Somanchi A. (2006). The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic resistance. In: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants (Tuzun S. and Bent E., eds), Springer Science+Business Media, New York, United States of America, pp. 112-142.

Umemura K., Tanino S., Nagatsuka T., Koga J., Iwata M., Nagashima K. et Amemiya Y. (2004). Cerebroside elicitor confers resistance to *Fusarium* disease in various plant species. *Phytopathology*, **94**, 813-819.

Van Baarlen P., Woltering E.J., Staats M. et Van Kan J.A.L. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 41-54.

Vandamme P., Govan J. et LiPuma J. (2007). Diversity and role of *Burkholderia* spp. In: *Burkholderia*, molecular microbiology and genomics (Coenye T. and Vandamme P., eds), Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom, pp 1-28.

Vandamme P., Goris J., Chen W.M., De Vos P. et Willems A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, **25**, 507-512.

Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D., Bentéjac M. et Pugin A. (2006). Integrated signalling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein



- kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 429-440.
- Van der Ent S., Van Wees S.C. et Pieterse C.M.J. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, **70**, 1581-1588.
- Van Hulst M., Pelser M., van Loon L.C., Pieterse C.M.J. et Ton J. (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, **103**, 5602-5607.
- van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., van der Heijdt W.H.W., Wendehenne D. et Pugin A. (2008). Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**, 1609-1621.
- van Loon L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, **119**, 243-254.
- van Loon L.C., Geraats B.P.J. et Linthorst H.J.M. (2006a). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, **11**, 184-191.
- van Loon L.C., Rep M. et Pieterse C.M.J. (2006b). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 135-162.
- van Loon L.C. et Strien E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 85-97.
- van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. et Pieterse C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 453-483.
- van Loon L.C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 753-765.
- van Loon L.C. et van Kammen A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, **40**, 190-211.
- Van Oevelen S., De Wachter R., Vandamme P., Robbrecht E. et Prinsen E. (2002). Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (Rubiaceae, angiosperms) and proposal of 'Candidatus *Burkholderia kirkii*' (Proteobacteria beta). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 2237-2240.
- Van Peer R., Niemann G.J. et Schippers B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, **81**, 728-734.
- van Wees S.C.M. et Glazebrook J. (2003). Loss of non-host resistance to *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *The Plant Journal*, **33**, 733-742.
- Varnier A-L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J.H., Kauffmann S., Pugin A., Clément C., Baillieux F. et Dorey S. (2009). Bacterial rhamnolipides are novel MAMPS conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell and Environment*, **32**, 178-193.
- Vega F.E., Simpkins A., Aime M.C., Posada F., Peterson S.W., Rehner S.A., Infante F., Castillo A. et Arnold A.E. (2009). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, **3**, 122-138.
- Verberne M.C., Hoekstra J., Bol J.F. et Linthorst H.J.M. (2003). Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant Journal*, **35**, 27-32.
- Verhagen B.W.M., Trotel-Aziz P., Couderchet M., Höfte M. et Aziz A. (2010). *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 249-260.
- Verhagen B.W.M., Glazebrook J., Zhu T., van Loon L.C. et Pieterse C.M.J. (2004). The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 895-908.
- Verma S.C., Singh A., Chowdhury S.P. et Tripathi A.K. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp., using green fluorescent protein reporter. *Biotechnology Letters*, **26**, 425-429.
- Verslues P.E. et Zhu J-K. (2005). Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals



- that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions*, **33**, 375-379.
- Vessey J.K. (2003). Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**, 571-586.
- Vigers A.J., Wiedemann S., Roberts W.K., Legrand M., Selitrenikoff C.P. et Fritig B. (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related protein are antifungal. *Plant Science*, **83**, 155-161.
- Vijayan P., Shockey J., Lévesque C.A., Cook R.J. et Browse J. (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceeding of The National Academy of Sciences USA*, **95**, 7209-7214.
- Vogel J.L., Balandreau J., Van Antwerpen T., Dana P. et Cadet P. (2002). Isolation and characterization of sugarcane rhizobacteria and their effect on nematodes. *Proceedings of south african Sugar Technologists Association*, **76**, 305-309.
- Waller F., Ahatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Hückelhoven R., Neumann C., Von Wettstein D., Franken P. et Kogel K.H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **102**, 13386-13391.
- Walley J.W., Coughlan S., Hudson M.E., Covington M.F., Kaspi R., Banu G., Harmer S.L. et Dehesh K. (2007). Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel *cis*-element. *PLOS Genetics*, **3**, 1800-1812.
- Wang D., Pajeroska-Mukhtar K., Culler A.H. et Dong X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, **17**, 1784-1790.
- Wang D., Amornsiripanitch N. et Dong X. (2006a). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLOS Pathogens*, **2**, e123.
- Wang K., Conn K. et Lazarovits G. (2006b). Involvement of quinolinate phosphoribosyl transferase in promotion of potato growth by a *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 760-768.
- Wang K.L-C, Li H. et Ecker J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell*, **14**, 131-151.
- Ward J., Pei Z. et Schroeder J. (1995). Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell*, **7**, 833-844.
- Wasilewskaa A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon C., Frei dit Frey N. et Jeffrey Leung. (2008). An update on abscisic acid signalling in plants and more. *Molecular Plant*, **1**, 198-217.
- Wendehenne D., Lamotte O., Frachisse J., Barbier-Brygoo H. et Pugin A. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell*, **14**, 1937-1951.
- West E.R., Cother E.J., Steel C.C. et Ash G.J. (2010). The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*, **56**, 209-216.
- Whipps J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 487-511.
- Wijaya R., Neumann G.M., Condrón R., Hugues A.B. et Polya G.M. (2000). Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Science*, **6**, 243-255.
- Woodward A.W. et Bartel B. (2005). Auxin: regulation, action, and regulation. *Annals of Botany*, **95**, 707-735.
- Wopperer J., Cardona S.T., Huber B., Jacobi C.A., Valvano M.A. et Eberl L. (2006). A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 1579-1587.
- Xiao H., Tattersall E.A., Siddiqua M.K., Cramer G.R. et Nassuth A. (2008). *CBF4* is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant Cell and Environment*, **31**, 1-10.
- Xiong L. et Zhu J-K. (2001). Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum*, **112**, 152-166.
- Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hshimoto Y., Ezaki T. et Arakawa M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov.; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981)



- comb. nov. *Microbiology and Immunology*, **36**, 1251-1275.
- Yan Z., Reddy M.S., Ryu C.M., McInroy J.A., Wilson M. et Klopper J.W. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, **92**, 1329-1333.
- Yang J., Klopper J.W. et Ryu C-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, **14**, 1-4.
- Yang Y., Shah J. et Klessig D.F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development*, **11**, 1621-1639.
- Yi H.C., Joo S., Nam K.H., Lee J.S., Kang B.G. et Kim W.T. (1999). Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Molecular Biology*, **41**, 443-454.
- Yin H., Zhao X. et Du Y. (2010). Oligochitosan: a plant diseases vaccine-A review. *Carbohydrate Polymers*, **82**, 1-8.
- Yu M., Shen L., Fan B., Zhao D., Zheng Y. et Sheng J. (2009). The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. *Postharvest Biology and Technology*, **54**, 153-158.
- Yu D., Chen C. et Chen Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *The Plant Cell*, **13**, 1527-1540.
- Yu I.C., Parker J. et Bent A.F. (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**, 7819-7824.
- Zahavi T., Cohen L., Weiss B., Schena L., Daus A., Kaplunov T., Zutkhi J., Ben-Arie R. et Droby S. (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biology and Technology*, **20**, 115-124.
- Zeidler D., Zähringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. et Durner J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 15811-15816.
- Zhang Y., Yang X., Liu Q., Qiu D., Zhang Y., Zeng H., Yuan J. et Mao J. (2010). Purification of novel protein elicitor from *Botrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants. *Microbiological Research*, **165**, 142-151.
- Zhang B., Ramonell K., Somerville S. et Stacey G. (2002). Characterisation of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, 963-970.
- Zhao Z., Wang Q., Wang K., Brian K., Liu C. et Gu Y. (2009). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, **101**, 292-297.
- Zheng Z., Abu Qamar S., Chen Z. et Tesfaye M. (2006). *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, **48**, 592-605.
- Zhu Y.J., Agbayani R., Jackson M.C., Tang C.S. et Moore P.H. (2004). Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta*, **220**, 241-250.
- Zimmerli L., Jakab C., Métraux J.P. et Mauch-Mani B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by  $\beta$ -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 12920-12925.
- Zipfel C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 414-420.





# ANNEXE



## **Publication 5**

### **RNA extraction from grapevine woody canes for gene expression analysis by real-time RT-PCR**

Sophie Bordiec, Fanja Rabenoelina, Florence Mazeyrat-Gourbeyre, Christophe Clément and Fabienne Baillieul

Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes  
Unité de Recherche Vigne et Vins de Champagne, Stress et Environnement, UPRES EA 2069  
UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne  
51687 REIMS Cedex 2, FRANCE

Chapitre 19 in Methodologies and Results in Grapevine Research, (Delrot S., Medrano H., Or E., Bavaresco L., Grando S., eds), 2010



---

**RNA extraction from grapevine woody canes for gene expression analysis by real-time RT-PCR**

(Chap 19 in Methodologies and Results in Grapevine Research, (Delrot S., Medrano H., Or E., Bavaresco L., Grando S., eds), 2010)

---

Sophie Bordiec, Fanja Rabenoelina, Florence Mazeyrat-Gourbeyre, Christophe Clément and Fabienne Baillieul<sup>(\*)</sup>

Laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes  
Unité de Recherche Vigne et Vins de Champagne, Stress et Environnement, UPRES EA 2069  
UFR Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne  
51687 REIMS Cedex 2, FRANCE

<sup>(\*)</sup> corresponding author (email: fabienne.baillieul@univ-reims.fr)

---

**Abstract**

RNA extraction from grapevine, as from all woody plants, is known to be problematic. Several methods have been developed last years, among which some are available for extraction from wood, but they are usually time-consuming, or validated for northern hybridization. Here we present a rapid method for RNA extraction effective for studying grapevine wood gene expression by real-time RT-PCR.

**Key words:** grapevine, RNA, real-time PCR, gene expression, wood

**Abbreviations:** CTAB: cetyltrimethylammonium bromide; DEPC: diethylpyrocarbonate; RT-PCR: reverse-transcription polymerase chain reaction; TAE: Tris-Acetate-EDTA; *VvGluc*: grapevine gene coding for glucanase; *VvSTS*: grapevine gene coding for stilbene synthase

---

**INTRODUCTION**

RNA quality and integrity are the main limiting factors in the application of RT-PCR techniques. RNA extraction from woody plants, such as grapevine, is particularly difficult due to their high content in carbohydrates, acids, tannins and phenolics (Loulakakis et al. 1996) which may limit extraction yield, RNA quality and inhibit subsequent enzymatic reactions (Wang et al. 2000).

Many methods have been developed to extract RNA from woody plants such as forest trees (Allona et al. 1998, Wang et al. 2000, Le Provost et al. 2007) and fruit trees (Gambino et al. 2008). They involve the use of ultracentrifugation steps (Loulakakis et al. 1996, Gambino et al. 2008), CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Gambino et al. 2008) or extraction/purification kits (Wang et al. 2000, Le Provost et al. 2007, Gambino et al. 2008). These protocols are usually not adapted for RNA extraction from wood or are time-consuming (two-day extraction, treatment of plastic/glasswares and solutions with DEPC (diethylpyrocarbonate)).

Several methods exist for RNA extraction from grapevine but they were developed for *in vitro* plantlets (Thomas and Schiefelbein 2002, Thomas et al. 2003), leaves and roots (Loulakakis et al. 1996, Moser et al. 2004, Gambino et al. 2008),

cell cultures (Loulakakis et al. 1996) or for the detection of pathogens in wood (MacKenzie et al. 1997, Nassuth et al. 2000, Osman and Rowhani 2008). Recently, Gambino et al. (2008) proposed a rapid CTAB method for extracting RNA from mature canes suitable for northern blotting analysis.

Here we present another rapid and simple method for RNA extraction from wood, validated for gene expression analysis by real-time RT-PCR.

**MATERIAL AND METHODS****Plant material and sampling**

Woody canes were collected from vegetative or fruiting woody cuttings. Woody canes were cut in 1 cm long pieces after removal of epidermis. They were frozen in liquid nitrogen, then stored at -80°C until use. Samples were ground in liquid nitrogen to a fine powder with a laboratory ball mill with inox grinding balls of 30 mm diameter (Prolabo).

**RNA extraction protocol**

Solutions were not treated with DEPC and all experiments until PCR were realized with disposable RNase-free tips and microcentrifuge tubes.



The Concert™ Plant RNA reagent method for small scale RNA isolation was used according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, ref 12322-012) but with modifications. One hundred mg of powdered sample were extracted by adding 0.5 mL of cold 'Plant RNA reagent'. Following a strong vortexing for 90 seconds, the mixture was incubated for 5 min at room temperature. After centrifugation at 12,000 *g* for 2 min, the supernatant was extracted twice with 300  $\mu$ L of chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v) and centrifugated at 12,000 *g* for 10 min at 4°C. The upper phase was collected in a new tube and RNA was precipitated with an equal volume of isopropanol and 100  $\mu$ L of 5M NaCl. Following 10 min incubation at room temperature, RNA was pelleted by centrifuging at 12,000 *g* for 10 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet was washed with 75% ethanol, air-dried for approximately 20 min and resuspended in 10  $\mu$ L of milliQ water. Genomic DNA was removed with RNase-free DNase treatment (Promega, ref 9PIM610). Five  $\mu$ L of total RNA were treated with 1 U of enzyme according to manufacturer's instructions.

#### RNA analysis

RNA purity and concentration were assessed by determining the spectrophotometric absorbance of the samples at 260 and 280 nm and ratios  $A_{260}/A_{280}$ . RNA integrity was evaluated from the 28S and 18S rRNA bands on 1% agarose gel after electrophoresis in 0.5X TAE (Tris-Acetate-EDTA), staining with ethidium bromide and visualisation under UV light.

#### Real-time RT-PCR

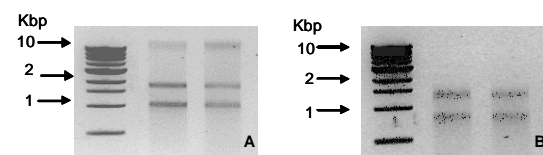
One hundred and fifty ng of total RNA were reverse-transcribed by using the Verso SYBR Green 2-Step QRT-PCR Rox kit (ThermoElectron, ref AB-4113/A). RT conditions were 42°C for 30 min, then 2 min at 95°C.

PCR reactions were carried out in 96-well plates (15  $\mu$ L per well) in a reaction buffer containing 1X SYBR green I mix (Absolute Blue QPCR SYBR Green, ThermoElectron, ref AB-4162/B ; including *Taq* polymerase, dNTPs, SYBR Green), 280 nM primers (forward and reverse) and 5  $\mu$ L of cDNA diluted 10 times. PCR conditions were 95°C for 15 s (denaturation) and 60°C for 1 min (annealing/extension) for 40 cycles on a Chromo4 thermocycler (Bio-Rad). PCR efficiency of the primers sets was calculated by performing real-time PCR on several dilutions. We used the following *VvEF1 $\alpha$*  primers: *VvEF1 $\alpha$ -F* (5'-GAACTGGGTGCTTGATAGGC-3') and *VvEF1 $\alpha$ -R* (5'-AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA-3').

#### RESULTS AND DISCUSSION

Canes were ground in a fine powder with a ball grinder that allowed easy and fast processing of numerous samples.

Epidermis was removed from the canes before grinding. Initially, extractions were done with whole wood cuttings, but RNA was difficult to resuspend in water and solutions were sticky, suggesting the presence of undesirable compounds which may interfere for further analysis. Moreover, RNA gel electrophoresis revealed some RNA degradations (data not shown). So we tested extractions without the epidermis which is a dead tissue. However, the suber, which is a living tissue, was also eliminated because it was linked to epidermis. In this case, RNA resuspended easily, and for all RNA samples tested, distinct 28S and 18S rRNA bands (about 1.7 and 1 Kbp respectively) without degradation were observed after gel electrophoresis analysis (Fig. 1A), indicating that we obtained good integrity RNA. Unfortunately genomic DNA contamination was also observed (band above 10 Kbp).



**Fig.1** Total RNA extracted before (A) and after (B) DNase treatment for 2 wood samples. On each gel electrophoresis, the first lane corresponds to 1 Kb DNA ladder (Ozyme, ref N3232S). (A) One  $\mu$ L of extract was loaded. (B) Control of DNase efficiency for 150 ng of treated total RNA.

DNA is particularly troublesome in gene expression studies using PCR because its presence contributes to false representation of gene expression within a given RNA sample. DNase treatment was then included at the end of the RNA extraction protocol and efficiently removed DNA without RNA degradation (Fig. 1B). Lack of DNA contamination was also checked by performing a standard PCR with primers designed to amplify a fragment of the housekeeping gene actin (accession number AF369524), using directly DNase-treated RNA as template, omitting the prior RT step. No amplification was observed (data not shown).

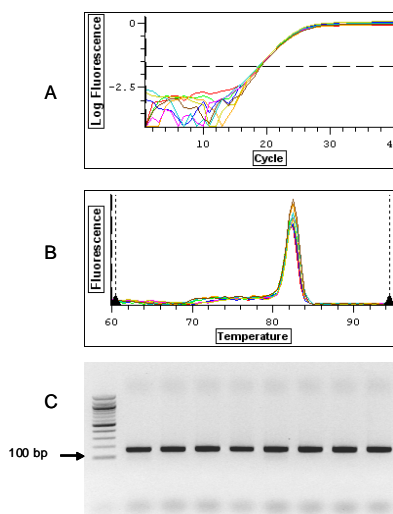
Quality and quantification of extracted RNA (after DNase treatment) were estimated by spectrophotometry. The  $A_{260}/A_{280}$  ratio was comprised between 1.6 and 2, and the average yield was about 4  $\mu$ g total RNA per 100 mg of starting plant material.  $A_{260}/A_{280}$  ratio lower than 1.8 suggests minor protein contamination, but this did not interfere with further molecular analysis (RT and real-time PCR). Usually, within a series of extractions, RNA yield and quality were close for all samples, but they varied between experiments, possibly depending on the physiological status of the plant or room temperature. In some cases, yield reached 10  $\mu$ g RNA per 100 mg of starting material. Compared with methods established on stem from grapevine plantlets (Thomas and Schiefelbein 2002, Thomas et al. 2003) or mature canes (Gambino et al. 2008), this protocol provided RNA





of good quality with a lesser or equivalent yield. In fact, except for the modified CTAB method from Gambino et al. (2008), 'fast extraction' methods usually gave RNA of good quality associated with a low yield compared to time-consuming protocols. Nevertheless, yield of extracted RNA was over than necessary for subsequent real-time RT-PCR analysis because only 150 ng of total RNA were used for reverse-transcription and cDNA were diluted 30 times (final volume) for gene expression analysis.

The cDNAs were amplified by PCR and the housekeeping gene *VvEF1a* (Terrier et al. 2005) was used for normalization. Real-time PCR was successfully performed (Fig. 2A). Analysis of the melting curves as well as agarose gel electrophoresis of PCR *VvEF1a* products revealed specific amplification (Fig. 2B and 2C). Efficiency of *VvEF1a* primers was well-established with 96% efficiency validated over 4 log (data not shown). The average Ct for *VvEF1a* gene expression was around 20. Efficiency of primers specific to other genes, like those implicated in defense mechanisms, were also tested with good efficiencies (data not shown). For example, the Ct values, corresponding to basal expression, of *VvGluc* coding for a glucanase (a pathogenesis-related protein) and *VvSTS* coding for the stilbene synthase (implicated in the resveratrol biosynthesis pathway) were respectively around 26 and 23.



**Fig.2** (A) Amplification plot of real-time RT-PCR targeting *VvEF1a* gene. (B) Melting curve for *VvEF1a* amplification products. (C) Agarose gel electrophoresis analysis of the real-time RT-PCR products. The first lane corresponds to 100 bp DNA ladder (Ozyme, ref N3231S). The presented data are a duplicate of 4 different samples.

Our protocol is also available for RNA extraction from other grapevine tissues from plantlets (roots, stem, leaves) or cuttings (roots, leaves and flowers). On cuttings, RNA yields from roots and leaves were respectively  $7.6 \pm 0.9$  and  $22 \pm 5$   $\mu\text{g}$  per 100 mg of plant material, our method giving a better yield for leaves than

the modified CTAB method (Gambino et al. 2008). RNA extracted from cuttings leaves were directly free of contaminant genomic DNA.

In conclusion, the simple protocol described here allows rapid (less than 3 h) extraction of RNA from grapevine woody canes. This method results in RNA quality and yield which are consistent for gene expression analysis by real-time RT-PCR and semi-quantitative RT-PCR.

## REFERENCES

- Allona I, Quinn M, Shoop E, Swope K, St Cyr S, Carlis J, Riedl J, Retzel E, Campbell MM, Sederoff R, Whetten RW (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9693-9698.
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I (2008) A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal* 19: 520-525.
- Le Provost G, Herrera R, Paiva JAP, Chaumeil P, Salin F, Plomoin C (2007) A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biol Res* 40: 291-297.
- Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA, Kanellis AK (1996) Isolation of functional RNA from grapevine tissues poor in nucleic acid content. *Am J Enol Vitic* 47: 181-185.
- MacKenzie DJ, McLean MA, Mukerji S, Green M (1997) Improved RNA extraction from woody plants for detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis* 81: 222-226.
- Moser C, Gatto P, Moser M, Pindo M, Velasco R (2004) Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues. *Mol Biotechnol* 26: 95-99.
- Nassuth A, Pollari E, Helmezczy K, Stewart S, Kofalvi SA (2000) Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J Virol Methods* 90: 37-49.
- Osman F, Rowhani A (2008) Real-time (TaqMan<sup>®</sup>) assays for the detection of viruses associated with rugose wood complex of grapevine. *J Virol Methods* 154: 69-75.
- Terrier N, Glissant D, Grimplet J, Barriou F, Abbal P, Couture C, Ageorges A, Atanassova R, Léon C, Renaudin JP, Dédaldéchamp F, Romieu C, Delrot S, Hamdi S (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* 222: 832-847.
- Thomas P, Lee MM, Schiefelbein J (2003) Molecular identification of proline-rich protein genes induced during root formation in grape (*Vitis vinifera* L.) stem cuttings. *Plant Cell Environ* 26: 1497-1504.
- Thomas P, Schiefelbein JW (2002) Improved method for purification of RNA from stem tissue of grapevine and its use in mRNA profiling. *Am J Enol Vitic* 53: 231-234.
- Wang SX, Hunter W, Plant A (2000) Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and white spruce. *BioTechniques* 28: 292-296.





## Résumé

La bactérie de type PGPR, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN, est capable de coloniser le système racinaire de la vigne et de diffuser jusqu'aux feuilles, inflorescences et baies. Mes travaux de thèse ont permis de mieux caractériser cette interaction. Nous avons tout d'abord montré que le contact de cellules de vigne avec la bactérie induit une alcalinisation du milieu, une expression de gènes de défense, une accumulation de composés phénoliques et des bursts oxydatif et nitrique. Ces résultats démontrent que cette bactérie est perçue par les cellules de vigne, cette perception engendrant une modification de son immunité. Par ailleurs, l'interaction entre la souche PsJN et la vigne confère à la plante une protection vis-à-vis de certains stress. Afin de mieux caractériser cette protection, nous avons analysé la mise en place de composés de défense en réponse à des stress biotique (*Botrytis cinerea*) ou abiotique (exposition à 4°C) dans des vitroplants entièrement colonisés par la bactérie.

Les plants bactérisés montrent une tolérance envers le froid (4°C). Cette protection est associée à la potentialisation de l'expression de gènes impliqués dans les réponses de défense (*Cbf4*, *Lox*, *PAL*, *STS* et certains codant des protéines PR). Parallèlement, une accumulation de proline, ainsi qu'une activation plus rapide des systèmes de détoxification de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des aldéhydes (marqueurs de la peroxydation des lipides membranaires) ont été observées.

Par ailleurs, il a été démontré que *B. phytofirmans* souche PsJN protège la vigne contre *B. cinerea*. L'étude de l'expression de plusieurs gènes de défense (*Lox*, *PAL*, *STS*, *17.3* et ceux codant certaines protéines PR) n'a pu révéler la potentialisation de leurs expressions, celles-ci étant même parfois moins induites chez les vitroplants entièrement bactérisés. Par contre, cette protection a été associée à une accumulation plus importante de phytoalexines (resvératrol et ε-viniférine).

Ces travaux démontrent donc que la relation bénéfique qui s'établit entre la vigne et la souche PsJN, se manifeste par une protection contre le froid (4°C) ou *B. cinerea* via le phénomène de potentialisation. Cependant, des résultats préliminaires montrent que la présence de la bactérie localement semble être un facteur déterminant pour l'établissement de la résistance dans la mesure où aucune protection contre ces stress n'a été obtenue en condition systémique.

**Mots clés :** vigne, *Burkholderia phytofirmans* souche PsJN, PGPR, défense, choc froid, *Botrytis cinerea*, potentialisation.