

Dossier d'activités

Présenté par

Sophie TROUVELOT

Plan du rapport :

1. Curriculum vitæ.....pp. 2-9
 2. Activités d'enseignement.....pp. 10-11
 3. Activités de recherche.....pp. 12-31
-

Coordonnées personnelles :

Résidence Mansart
11 Rue Albert & André Claudot
21000 Dijon

☎ 03.80.63.96.31

📞 06.72.72.21.12

E-mail : trouvelots@yahoo.fr

1. CURRICULUM VITAE

1.1 Etat Civil.

Sophie TROUVELOT

Née le 11/01/1973 (33 ans)

Vie maritale

Résidence Mansart

11 Rue Albert & André Claudot

21000 Dijon

☎ 03.80.63.96.31

☎ 06.72.72.21.12

E-mail : trouvelots@yahoo.fr



1.2 Titres Universitaires.

- | | |
|-----------|---|
| 1998-2002 | Thèse de Doctorat
Spécialité : Sciences de la Vie ; UFR Sciences Vie – Université de Bourgogne.
Mention très honorable avec les félicitations du jury. |
| 1998 | D.S.E.R.
mention Sciences de la Vie, UFR Sciences Vie – Université de Bourgogne.
Mention très honorable. |
| 1997 | D.E.A de Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Bourgogne.
Mention bien. |
| 1996 | Maîtrise de Biologie Cellulaire
mention Sciences et Technologies du Végétal, Université de Bourgogne.
Mention Assez Bien |
| 1995 | Licence de Biologie
Université de Bourgogne |
| 1994 | DEUG B
Université de Bourgogne |
| 1992 | Baccalauréat série D
Mention Bien, Lycée H. Fontaine, Dijon. |

1.3 Coursus professionnel et fonctions exercées.

- 2005 –
aujourd’hui **Contrat d’Ingénieur** à l’Université de Bourgogne
Recherche effectuée dans l’U.M.R. INRA 1088 - CNRS 5184 - Université de Bourgogne : Plante-Microbe- Environnement.
Sujet : « Etude de la stimulation des **réactions de défense** chez la **vigne** : mise au point de traitements **éliciteurs** induisant une **protection** contre le **mildiou** ou l’**oïdium** ».
Cette étude, soutenue par le Ministère de la Recherche, s’inscrit dans un projet labellisé RARE (Réseau Alimentaire Référence Europe) et consiste en la collaboration entre des partenaires privés (Sociétés Goëmar et Mœt et Chandon) et publiques (IMBP Orsay, Université de Bourgogne, Université de Reims, INRA de Dijon et INRA de Rennes). Ce travail est effectué sous la direction de Xavier Daire et Alain Pugin.
- 2001 - 2003 **Agent Temporaire d’Enseignement et de Recherche** à l’Université de Bourgogne (section C.N.U. 66)
➤ Recherche effectuée dans l’U.M.R. INRA – Université de Bourgogne : Microbiologie et Géochimie des Sols.
Sujet : « Etude du pouvoir protecteur d’un **champignon du sol** : analyse du comportement de la souche Fo47 dans l’**interaction avec la plante** ».
➤ Enseignements de biologie végétale et de biologie cellulaire, Faculté des Sciences de Dijon. (96 heures eq TD / an).
- 1998 - 2002 **Thèse de Doctorat.**
Ecole Doctorale « Sciences de la Vie », Université de Bourgogne.
Co-financement INRA – Région Bourgogne
Sujet : « Obtention et caractérisation, phénotypique et génotypique, de mutants de la souche *Fusarium oxysporum* Fo47, affectés dans leur aptitude antagoniste ». Travail réalisé dans l’U.M.R. Biochimie, Biologie Cellulaire et Ecologie des Interactions Plantes-Microorganismes, sous la direction de Claude Alabouvette.
- 1997 –2001 **Agent Temporaire Vacataire**, UFR Sciences de la Vie – Université de Bourgogne :
➤ Enseignement de biologie végétale à des étudiants de première année de DEUG B, Faculté des Sciences de Dijon (30 heures eq TD / an)
➤ Chargée de communication et de vulgarisation scientifique, Faculté de Pharmacie (70 heures eq TD en 2001).
- 04-06/1998 **Emploi temporaire de Chargée d’Etude** d’impact environnemental de **produits fertilisants** pour le compte de la SNST, Scories France, Groupe Usinor.
- 1997 – 1998 **Stagiaire de DSER** de Sciences de la Vie (Université de Bourgogne)
Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA de Dijon.
Sujet : « Analyse moléculaire d’une communauté de **champignons** endomycorhizogènes reconstruite en microcosme et appliquée à la **vigne** ». Travail réalisé sous la direction de Silvio Gianinazzi.
- 1996 - 1997 **Stagiaire de DEA** de Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire (Université de Bourgogne)
Laboratoire de Phytoparasitologie, INRA de Dijon
Sujet : « Caractérisation, à l’aide de sondes moléculaires, des glomales dans le **sol**, les racines et la **rhizosphère** de la **vigne micropropagée** ». Travail réalisé sous la direction de Diederik van Tuinen.
- 1995 **Stage volontaire** de 6 semaines au Laboratoire de Phytoparasitologie de l’INRA de Dijon.
Sujet : « Caractérisation des champignons endomycorhizogènes arbusculaires par des techniques de biologie moléculaire ». Travail réalisé sous la direction de Diederik van Tuinen.

1.4 Publications scientifiques.

- Publications dans des revues internationales à comité de lecture :
 - **Trouvelot S.**, A.-L. Varnier, L. Mercier, M. Allègre, F. Baillieul, C. Arnould, V. Gianinazzi-Pearson, A. Pugin and X. Daire (2006) A β -1,3 glucan sulfate potentiates defense response and induces resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine (en cours de rédaction)
 - **Trouvelot S.**, C. Olivain, G. Recorbet, Q. Migheli, and C. Alabouvette (2002) Recovery of mutants impaired in their antagonistic activity after transposition of the *Fot1* element in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 92, 936-945.
 - **Trouvelot S.**, D. van Tuinen, M. Hijri and V. Gianinazzi-Pearson (1999) Visualization of DNA loci in interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence *in situ* hybridization. *Mycorrhiza*, 8, 203-206.
 - Allègre M., X. Daire, M.-C. Heloir, **S. Trouvelot**, L. Mercier, M. Adrian and A. Pugin (2006) Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola* infected grapevines leaves. *New Phytologist* (sous presse).
 - Olivain C., **S. Trouvelot**, M.-N. Binet, C. Cordier, A. Pugin and C. Alabouvette (2003) Comparison of colonisation of flax roots and early physiological responses of flax cells induced by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9, 5453-5462.
 - Recorbet G., C. Steinberg, C. Olivain, V. Edel, **S. Trouvelot**, E. Dumas, S. Gianinazzi and C. Alabouvette (2003) Wanted : pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*, *New Phytologist*, 159, 1, 73-92.

- Publications dans des revues internationales sans comité de lecture :
 - **Trouvelot S.**, M. Allègre, J.-M. Joubert, A. Pugin. and X. Daire (2006) Cytological aspects of oligosaccharide-induced resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine. *Bulletin de l'OILB* (sous presse).

- Publications dans des revues nationales :
 - **Trouvelot S.**, C. Dubreuil, A. Gauthier, A. Pugin, X. Daire et B. Poinssot (2006) La potentialisation des défenses naturelles des plantes : état des lieux et perspectives. *Phytoma*. 598, 38-41.

1.5 Congrès scientifiques.

- Communications orales dans des congrès internationaux:
 - **Trouvelot S.**, Allègre M., Joubert, J.-M., Pugin A, Daire X. (2006) Cytological aspects of elicitor-induced resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine. Abstract Book, Breeding for inducible resistance against pests and diseases, Heraklio, Crete, 27-29 Avril 2006.
 - **Trouvelot S.**, C. Olivain, G. Recorbet, Q. Migheli and C. Alabouvette (2002) Characterization of *Fusarium oxysporum* Fo47 mutants affected in their biocontrol activity after transposition of the *Fot1* element. In G. Vannacci and S. Sarrocco (Eds.), Abstract Book, 6th European Conference on Fungal Genetics, Pisa, Italy, 6-9 Avril, p292 (VIo-4).

- **Trouvelot S.,** M. Hijri, D. van Tuinen, H. Dulieu and V. Gianinazzi-Pearson (1998) Characterization of internuclear variability in glomalean fungi by fluorescence *in situ* hybridization of ribosomal DNA loci. In “ICOM II”, 2nd International Conference on Mycorrhiza, Uppsala, Suède, 5-10 Juillet 1998.
 - Olivain C., **S. Trouvelot,** A. Pugin and C. Alabouvette (2002) Early defence reactions of flax cells in response to contact with conidia of a non pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* Fo47. Dans “8th New Phytologist Symposium (NPS 2002)”, Helsinki, Finlande, 9-14 Juin 2002.
- Communications orales dans des congrès nationaux:
 - **Trouvelot S. (2006)** Un point sur la stimulation des réactions de défense chez la vigne. Dans « Colloque RVVS », 12-13 Juin, Dijon.
 - **Trouvelot S.,** C. Olivain, G. Recorbet, C. Alabouvette, Q. Migheli (2002) Ottenimento di mutanti ad alterata attività biologica a partire dal ceppo antagonista *Fusarium oxysporum* Fo47 tramite mutagenesi mediata dal trasposone *Fot1*. IX Convegno Nazionale SIPaV « Innovazioni in Patologia Vegetale », 1-2 Octobre 2002, Rome.
 - **Trouvelot S.,** L. Philippot, C. Olivain, M.-J. Daboussi et C. Alabouvette (2001) Obtention et caractérisation, chez le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum*, de souches altérées dans leur activité antagoniste après transposition de *Fot1*. Dans « 5^{ème} Congrès de Société Française de Phytopathologie », 26-29 Mars, Angers, p132.
 - **Trouvelot S.,** V. Gianinazzi-Pearson et S. Gianinazzi (1998) Endomycorhization de la vigne. Exposé dans le cadre de la journée consacrée aux recherches sur les sols viticoles et co-organisée par l'INRA et le CIST Vigne et Vin. Centre INRA de Dijon.
 - Olivain, C., **S. Trouvelot,** A. Pugin, et C. Alabouvette (2001) Réponse différentielle des cellules de lin en interactions avec des souches pathogènes ou non pathogènes de *Fusarium oxysporum*, 109. Dans « 5^{ème} Congrès de la Société Française de Phytopathologie », 26-29 Mars, Angers.
 - Posters dans des congrès internationaux :
 - **Trouvelot S.,** V. Edel, G. Recorbet, C. Olivain, M.-J. Daboussi and C. Alabouvette (2000) Recovery of strains impaired in their antagonistic activity after transposition of the *Fot1* element in *Fusarium oxysporum*. In B. Felenbok and B. Turcq (Eds.), Fungal Genetics, 5th European Conference on Fungal Genetics, Arcachon, France, 25-29 Mars, p168 (IV-34).
 - Olivain, C., **S. Trouvelot,** and C. Alabouvette (2003) Early physiological responses of flax cells challenged with conidia of pathogenic and non pathogenic *Fusarium oxysporum*. Paper read at 8th International Congress of Phytopathology, at Christchurch, Nouvelle Zélande, 31.01-08.02.2003
 - Posters dans des congrès nationaux :
 - **Trouvelot S.,** C. Olivain, G. Recorbet, C. Steinberg and C. Alabouvette (2001) Phenotypic characterization of Fo47 mutants affected in their biocontrol activity. 25 (résumé). In : 3^{ème} Colloque Rhizosphère, pp 134, Dijon, France, 26-28 Novembre.
 - **Trouvelot S.,** V. Edel, G. Recorbet, C. Olivain, M.-J. Daboussi et C. Alabouvette (2000) Obtention, chez le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum*, de souches altérées dans leur activité antagoniste après transposition de l'élément *Fot1*. Dans « V^{ème} forum des jeunes chercheurs », Besançon, France, 23-24 Juin.

- Olivain C., **S. Trouvelot**, K. Stawiecki, A. Pugin et C. Alabouvette (2001) Perte conjointe du pouvoir pathogène et du pouvoir antagoniste par mutation transpositionnelle chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. . Dans « 5^{ème} Congrès de Société Française de Phytopathologie », Angers, France, 26-29 Mars, p143.
- Olivain C., **S. Trouvelot**, A. Pugin et C. Alabouvette (2001) Réponse différentielle des cellules de lin en interaction avec des souches pathogènes ou non pathogènes de *Fusarium oxysporum*. Dans « 5^{ème} Congrès de Société Française de Phytopathologie », 26-29 Mars, Angers, p109.

1.6 Rapports.

- Rapports diplômants :
 - **Trouvelot S.** (2002) Obtention et caractérisation, phénotypique et génotypique, de mutants de la souche *Fusarium oxysporum* Fo47, affectés dans leur aptitude antagoniste. Thèse de Doctorat en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université de Bourgogne, 180 pp.
 - **Trouvelot S.** (1998) Analyse moléculaire d'une communauté de champignons endomycorhizogènes reconstruite en microcosme et appliquée à la vigne. Mémoire de DSER de Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bourgogne.
 - **Trouvelot S.** (1997) Caractérisation, à l'aide de sondes moléculaires, des Glomales dans les sol, les racines et la rhizosphère de la vigne micropropagée. Mémoire de DEA de Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bourgogne.

- Rapports à diffusion restreinte :
 - **Trouvelot S.**, X. Daire, M. Adrian, C. Gauvrit et A. Pugin (01/2005 – 12/2006) Rapports d'activité pour la Société Goëmar (Saint-Malo). Quatre rapports distincts, d'une quarantaine de pages chacun et rédigés à raison d'un exemplaire tous les 6 mois.
 - **Trouvelot S.**, P. Duquenne (1998) Effet d'un amendement sidérurgique sur la microflore indigène d'un sol. Rapport de mission pour SNST Scories France (Groupe Usinor), 40p

1.7 Domaines de compétence.

- Recherche :
- Bio-protection de la **vigne** : étude de la **stimulation des réactions de défense** chez la vigne en conditions semi-contrôlées (sous serres et au vignoble) ; étude de l'impact de la **mycorhization** de la vigne micropropagée sur l'acclimatation des vignes produites *in vitro* ;
 - Lutte biologique : étude du pouvoir protecteur d'un **champignon du sol**, la souche fongique Fo47 (*Fusarium oxysporum*), contre la fusariose vasculaire ;
 - Mise au point d'une technique d'hybridation (FISH) permettant la localisation *in situ* de gènes ribosomiques sur le noyau de **champignons symbiotiques** (Glomales) ;
 - Etude de l'impact de **fertilisants** sidérurgiques sur les **communautés microbiennes** favorisant la santé des plantes (Glomales, Rhizobium).
- Techniques de:
- Phytopathologie : inoculation de microorganismes sur plante entière ; évaluation de la maladie (mildiou et oïdium de la vigne, fusariose vasculaire) par suivi de l'apparition des symptômes ; analyse de survie.
 - Phytoprotection : réalisation de traitements phytosanitaires (fongicides et/ou éliciteurs des réactions de défense) ; étude et amélioration de la pénétration foliaire de molécules d'intérêt en association avec des adjuvants.
 - Microbiologie : travail en condition d'aseptie ; isollements de microorganismes du sol ; caractérisation biochimique des familles bactériennes et fongiques, physiologie bactérienne et fongique ; caractérisation des champignons du genre *Fusarium* et des glomales (endomycorhizogènes) ;
 - Cytologie : cultures cellulaires végétales, culture *in vitro*, microscopie (à fluorescence, confocale laser, électronique à balayage et électronique à transmission) ;
 - Biologie moléculaire : extractions d'ADN/ARN, PCRs, Hybridations moléculaires et *in situ*, clonage, banque génomique en phage, mutagenèse insertionnelle par transposon, analyse de séquence (NCBI, Mascot) ;
 - Biochimie : dosages de certains marqueurs de la résistance des plantes (FAO, ⁴⁵Ca, PAL), extractions protéiques, électrophorèses mono et bi-dimensionnelle ;
- Communication, rédaction et synthèse
- Rédaction d'articles scientifiques (revues nationales et internationales) et de rapports de synthèse ;
 - Exposés, oraux ou posters, au cours de conférences nationales et internationales ;
 - Conception d'outils de communication : plaquettes, transparents pédagogiques

<u>Vulgarisation scientifique :</u>	<p>Implication dans les projets « <i>Experimentarium</i> » (C.C.S.T.I. de Bourgogne) et « Exposciences ».</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Conception et réalisation d'une exposition sur le thème : « L'ADN : à quoi ça sert et comment l'extraire ? » ; ➤ Rédaction d'une plaquette de présentation.
<u>Enseignements :</u>	Réalisation de cours (TP - TD) et encadrement d'étudiants de 1 ^{er} cycle universitaire.
<u>Encadrement et Formation :</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Encadrement de stagiaires niveau Bac+2 à Bac+5 ; ➤ Formation de techniciens de recherche ; ➤ Chef d'équipe du projet EDIFICE
<u>Organisation événementielle :</u>	<p>(i) Organisation de la journée DEFI'99 (Docteurs et Entreprises : un Futur Innovant). Premier événement de ce type organisé en Région Bourgogne (30 entreprises, 40 institutionnels & 70 jeunes scientifiques)</p> <p>(ii) Organisation des Rencontres « EDIFICE » (Entreprise & Docteur : Imaginons un Futur Innovant à Construire Ensemble) 2001-2002.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Réalisation de plaquettes de présentation ; ➤ Réalisation d'enquêtes écrites et téléphoniques ; ➤ Conception de posters et de diaporamas ; ➤ Gestion des relations avec la presse écrite ; ➤ Animation de tables rondes et de débats.
<u>Photographie :</u>	<p>Maîtrise de la photographie argentique et numérique</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Développement & tirage noir et blanc ; ➤ Retouche numérique & montage ; ➤ Réalisation d'une banque de photographies pour l'Université de Bourgogne (micro et macroscopie).
<u>Langues :</u>	Anglais : lu, écrit, parlé
<u>Informatique :</u>	Maîtrise de la bureautique (suite Microsoft Office) ; PAO (Photoshop, Illustrator, Acrobat) ; statistique (Statview, Statgraphics) ; bases de données (Endnote, Filemaker) ; intra et internet; création d'un site internet ; environnement Mac & PC.

1.8 Formation continue.

Organisée par l'INRA :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ gestion de projet (40h) ➤ techniques de communication : dynamiser sa parole face à un auditoire (18h) ➤ bilan de potentiels (24h)
Organisée par l'Université de Bourgogne :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ ingénierie de la qualité (40h) ➤ propriété industrielle (24h) ➤ gestion de ressources humaines (méthode « <i>Potentialis</i> », 18h). ➤ du marketing au produit fini (120h)

1.9 Activités extra-professionnelles.

- Passionnée de photographie : Premier prix 1998 du reportage photographique noir et blanc de la section A.D.A.S. photo de l'INRA (prix national) ;
- Danse classique (médaillée du Conservatoire National de Région de Dijon).

2. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT.

Attirée par la pédagogie, j'ai initié mon expérience d'enseignement en réalisant dans un premier temps des vacances à l'Université de Bourgogne.

J'ai tout d'abord encadré des travaux dirigés et pratiques de biologie végétale durant trois ans en tant qu'**A.T.V.** (Agent Temporaire Vacataire). Ces enseignements ont été effectués à raison d'environ 30 heures équivalent TD par année universitaire.

Puis, dans une approche de vulgarisation scientifique, j'ai effectué des **vacations** en tant que chargée de **communication scientifique** dans le cadre du projet « *Expérimentarium* » mis en place par l'Université de Bourgogne et le C.C.S.T.I. (Centre de Communication Scientifique et Technique) de Bourgogne. Mon travail, correspondant à 70 heures d'enseignement, a consisté à initier des classes, des cours primaires à la 3^{ème}, aux concepts de la recherche biologique au travers d'une expérience ludique telle que l'extraction d'ADN d'oignon. Dans ce contexte, j'ai expliqué à un public jeune (9-16 ans), suivant des termes clairs et adéquats, le sens du sigle A.D.N. et le rôle de cette molécule. Grâce à une « fiche de recette » éditée pour l'occasion, j'ai fait réaliser à ces « scientifiques en herbe » une extraction d'ADN à partir d'un oignon avant d'aborder un débat sur le métier de chercheur.

A.T.E.R. durant les années universitaires 2001-2003 (section CNU 66), j'ai pu participer activement à l'organisation des enseignements de **biologie végétale** et de **biologie cellulaire** pour les étudiants en première année de Deug B. J'ai notamment eu en charge, chaque année, l'enseignement de travaux pratiques et de travaux dirigés de ces matières pour huit groupes d'une trentaine d'étudiants.

L'ensemble de mes activités d'enseignement a été détaillé dans le tableau 1 (page suivante). La fonction exercée en tant qu'assistant consistait à (i) seconder l'enseignant dans l'organisation matérielle des TP : préparation des échantillons à observer, à disséquer et à analyser par les étudiants ; préparation du matériel nécessaire à la réalisation du TP ; et (ii) seconder l'enseignant dans l'encadrement direct des étudiants : réponses aux questions techniques ou scientifiques, conseils distribués aux étudiants quant à leur préparation / observation / analyse et interprétation.

La fonction exercée en tant qu'enseignant consistait à (i) organiser, structurer et dispenser des cours à partir d'un descriptif précis du module à enseigner et (ii) assurer les corrections des comptes rendus de TP au cours du semestre et rédiger les sujets d'examen nécessaires au contrôle des connaissances.

Au cours de ces 6 années d'enseignement, j'ai conçu et préparé des documents pédagogiques en utilisant des outils informatiques. De plus, j'ai réalisé des photographies, soit en prise de vue directe, soit d'après observation en microscopie photonique, de diverses préparations biologiques. Ces photographies servent actuellement de ressources pédagogiques pour l'Université de Bourgogne. Enfin, j'ai eu l'opportunité de concevoir des sujets d'examens dont j'ai assuré la correction et la notation.

Fonction	Année	Thématiques de l'enseignement	Niveau	Nombre de groupes	Nombre d'étudiants par groupe	Nombre d'heures annuel ¹
ATER (CNU 66) Enseignant TD ² /TP ³	2002-2003	Classification des végétaux et leurs cycles de reproduction.	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	12
		Les tissus conducteurs des végétaux ; reproduction des végétaux hétérospores ; morphologie florale ; étude des fruits et des graines.	DEUG B 1 ^{ère} Année	6	25 à 30	57
		Introduction à la microscopie ; comparaison Procaryotes / Eucaryotes ; étude de la cellule végétale ; étude des lois de l'osmose ; différenciation cellulaire.	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	24
ATER (CNU 66) Enseignant TD/TP	2001-2002	Sortie botanique : Connaissance des populations d'arbres, d'arbustes et de lianes d'une combe calcaire	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	6
		Classification des végétaux et leurs cycles de reproduction	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	12
		Les tissus conducteurs des végétaux ; reproduction des végétaux hétérospores ; morphologie florale ; étude des fruits et des graines	DEUG B 1 ^{ère} Année	6	25 à 30	57
		Introduction à la microscopie ; comparaison Procaryotes / Eucaryotes ; étude de la cellule végétale ; étude des lois de l'osmose ; différenciation cellulaire.	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	24
ATV Enseignant TD/TP	2000-2001	Classification des végétaux et leurs cycles de reproduction	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	12
		Les tissus conducteurs des végétaux ; reproduction des végétaux hétérospores ; morphologie florale ; étude des fruits et des graines	DEUG B 1 ^{ère} Année	1	25 à 30	11
ATV Communication		Chargée de communication et de vulgarisation scientifique dans le cadre du projet « Experimentarium » (CCSTI de Bourgogne) : démonstration d'extraction d'ADN.	DEUG B 1 ^{ère} Année			70
ATV Enseignant TD/TP	1999-2000	Classification des végétaux et leurs cycles de reproduction	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	12
		Les tissus conducteurs des végétaux ; reproduction des végétaux hétérospores ; morphologie florale ; étude des fruits et des graines	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	19
ATV Enseignant TD/TP	1998-1999	Classification des végétaux et leurs cycles de reproduction	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	12
		Les tissus conducteurs des végétaux ; reproduction des végétaux hétérospores ; morphologie florale ; étude des fruits et des graines	DEUG B 1 ^{ère} Année	2	25 à 30	19
ATV Assistant TP	1997-1998	Les tissus conducteurs des végétaux ; reproduction des végétaux hétérospores ; morphologie florale ; étude des fruits et des graines	DEUG B 1 ^{ère} Année	4	25 à 30	32
Total						371 heures

Tableau 1 : Services des enseignements dispensés à l'Université de Bourgogne (UFR Sciences Vie).

¹ nombre d'heures, exprimé en équivalent TD

² TD : Travaux Dirigés

³ TP : Travaux Pratiques

3. ACTIVITES DE RECHERCHE.

3.1 Etude de la stimulation des réactions de défense chez la vigne : mise au point de traitements éliciteurs induisant une protection contre le mildiou ou l'oïdium.

01/2005 – aujourd'hui : Projet labellisé RARE (Réseau Alimentaire Référence Europe).

Unité Mixte de Recherche – INRA, CNRS, Université de Bourgogne – Plante-Microbe - Environnement (PME ; Dijon) ; Partenaires privés : Sociétés Goëmar (Saint-Malo) et Moët et Chandon (Epernay).

Direction scientifique : Alain Pugin (Pr, Université de Bourgogne) et Xavier Daire (IR, INRA de Dijon)

Mots clés : **vigne**, réactions de défense, **éliciteur**, potentialisation, **phytoprotection**, mildiou, oïdium.

Remarques : La **confidentialité** de cette étude explique le manque de publications acceptées sur cette thématique (cf publications 1 et 4 - § 1.4). Des rapports à diffusion restreinte ont été rédigés tous les six mois (cf § 1.6).

3.1.1 Contexte scientifique et objectifs:

La **vigne** est **sensible** à de nombreux **pathogènes fongiques** (notamment *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* ou *Botrytis cinerea*) qui sont **combattus** essentiellement au moyen de la **lutte chimique**. En France, la viticulture consomme à elle seule 20% des pesticides (dont 80% de fongicides) tandis qu'elle ne représente que 3 % de la surface agricole utile. Cela est dû à la forte pression parasitaire rencontrée dans les vignobles, qui s'explique essentiellement par deux raisons : (i) les variétés de vigne cultivées (*Vitis vinifera* L.) sont sensibles au mildiou et à l'oïdium et (ii) la majorité des vignobles est située dans des zones géographiques dont le climat est favorable au développement de ces parasites. Si la toxicité des fongicides utilisés tend à diminuer, leur **utilisation en viticulture** n'en reste pas moins **préoccupante**. Les réglementations internationales incitent d'ailleurs à limiter l'utilisation des produits phytosanitaires en viticulture afin de maintenir voire améliorer la qualité du raisin tout en adoptant des pratiques qui respectent l'environnement et assurent la santé du consommateur. Dans ce contexte, les méthodes permettant de limiter l'emploi de fongicides sont particulièrement attendues.

La vigne est une plante pour laquelle la résistance aux pathogènes ne peut pas être obtenue par amélioration génétique (hybridation classique et génie génétique) dans le cadre de la législation actuelle. En effet, en France, les Appellations d'Origine Contrôlée font référence à des cépages définis qui permettent l'expression de la typicité d'un cru tandis que l'hybridation en particulier, provoque des remaniements parfois importants du patrimoine génétique des cépages et des modifications de la typicité variétale. Par ailleurs, l'INAO rejette, pour l'heure, la possibilité la possibilité d'utiliser des organismes génétiquement modifiés dans les vignes destinées à produire des vins d'AOC.

Une **alternative** à ces deux stratégies consiste à **activer les défenses naturelles de la plante à l'aide d'éliciteurs**, pour accroître sa tolérance aux pathogènes (Klarzynski et Fritig, 2001) en limitant l'emploi de produits phytosanitaires et la quantité de leurs résidus présents dans le vin.

A travers un projet de recherche porté par l'UMR PME, labellisé RARE (Réseau Alimentaire Référence Europe) et fondé sur la **collaboration entre des partenaires publics et privés**, nous sommes en charge (i) d'évaluer la capacité élicitrice de molécules d'origine naturelle (oligosaccharides) sur vigne ; (ii) évaluer leur aptitude à protéger cette plante contre des pathogènes cryptogamiques (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*) et (iii) comprendre leur mode d'action *in planta*.

3.1.2 Efficacité de protection des éliciteurs contre le mildiou et l'oïdium de la vigne :

Les oligosaccharides (OS) étudiés sont hydrophiles et, de ce fait, traversent certainement difficilement la cuticule foliaire, barrière hydrophobe constituée de cutine et de cires. Partant de l'hypothèse que l'amélioration de la pénétration des oligosaccharides dans la feuille améliorerait l'efficacité biologique de ces produits, nous avons entrepris la **sélection rationnelle d'adjuvants** (tensio-actifs, mouillants...) susceptibles d'**augmenter le taux de pénétration** de ces composés hydrophiles. Cette étude, réalisée sous la direction de C. Gauvrit (INRA de Dijon), nous a permis de sélectionner un adjuvant (codé ADJ) améliorant considérablement la pénétration des sucres, utilisé dans la préparation des solutions traitement à la dose de 0,1%.

3.1.2.1. Efficacité de protection contre le **mildiou** (*Plasmopara viticola*)

Dans la pratique, de jeunes boutures de vigne sensible (cultivar Marselan) ont été traitées par pulvérisation de la solution oligosaccharidique, jusqu'à ruissellement. Elles ont été inoculées, 2 jours post-traitement, par une suspension en sporanges de *Plasmopara viticola*. Six jours post-inoculation, les plantes ont été placées dans des conditions d'humidité saturante, à l'obscurité, pour déclencher la sporulation du parasite. Les observations ont consisté à estimer la surface foliaire sporulante sur les 3 premières jeunes feuilles adultes infectables. L'acide β -aminobutyrique (BABA) a été utilisé comme témoin positif car son efficacité contre le mildiou de la vigne a été amplement démontrée (pour exemple : Reuveni *et al.*, 2001). Un exemple de résultat de pathotest est donné dans la figure 1.

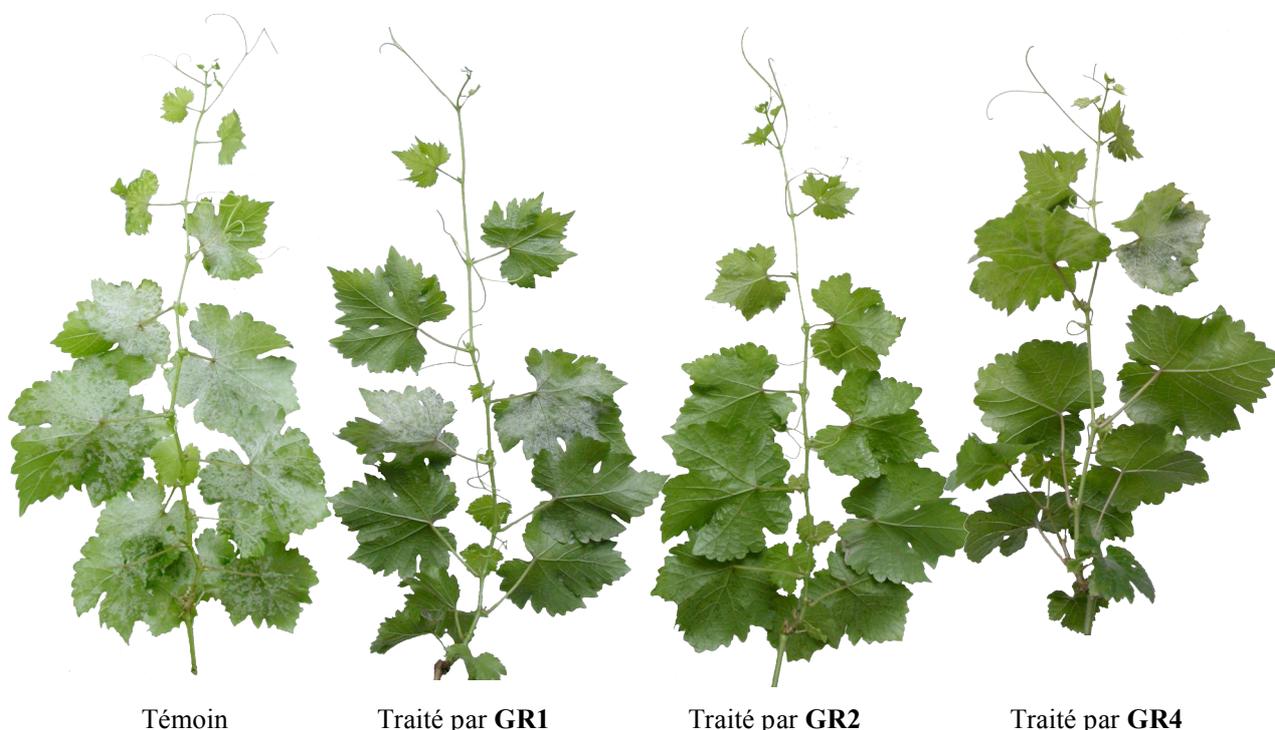


Figure 1 : Protection contre le mildiou induite, sur boutures, par différentes molécules oligosaccharidiques (GR1, GR2 et GR4). Traitement par pulvérisation. Oligosaccharides concentrés à 5 mg.ml^{-1} dans ADJ à 0,1%.

Les données du tableau 1 montrent, sur un nombre important de répétitions, que **GR2 est l'OS le plus efficace** (Taux de protection proche de **80%**), suivi de GR4. GR1 et GR15 sont présentés à titre de comparaison. Le premier s'avère nettement moins efficace que GR2 ou GR4, le second est dépourvu d'effet. Pourtant, ces deux molécules induisent des réactions de défense sur suspensions cellulaires de vigne. A travers ce résultat, il apparaît qu'il est difficile de relier l'activité élicitrice d'une molécule (évaluée sur cellules) à sa capacité à protéger la plante contre un agent pathogène donné.

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats d'induction de résistance chez la vigne (boutures) contre le mildiou par les molécules GR1, GR2, GR4, GR15 et BABA.

molécule	Dose (mg/mL)	Nombre de répétitions	Pourcentage moyen de surface sporulante chez les témoins	Pourcentage moyen de surface sporulante chez les traités	Taux de protection moyen
GR1	5	12	46,3	29,5	36,3 ± 28,4
GR2		21	64,9	14,9	76,3 ± 20,7
GR4		9	71,6	28,8	60,0 ± 27,2
GR15		1	100,0	100,0	0
BABA	3	4	60,2	13,2	78,1 ± 9,4

Par ailleurs, nous avons montré que **l'efficacité des oligosaccharides croît avec la dose** employée, l'efficacité optimale étant obtenue à 5 mg.mL⁻¹. De plus, **l'efficacité des OS testés est d'autant plus forte que la feuille sensible est âgée**. Tout se passe comme si le traitement renforçait la résistance liée à l'âge, naturellement observée en réponse au mildiou (Reuveni *et al.*, 1998). Le taux de protection est donc hétérogène sur une plante, les **jeunes feuilles étant moins protégées**. Ce résultat suggère la **non systémie des OS étudiés**, contrairement au BABA qui confère une protection quasi-totale des jeunes feuilles, supérieure à celle des feuilles de rangs suivants.

Enfin, nous avons montré que le traitement GR2 n'a **pas d'effet translaminaire** marqué, mais qu'il est capable d'induire, chez la vigne, une **protection** contre le mildiou **efficace durant au moins 9 jours** post-traitement.

3.1.2.2. Efficacité de protection par GR2 contre l'oïdium (*Erysiphe necator*)

Des plants de vigne sensible (cultivar Marselan) ont été traités par pulvérisation de la solution oligosaccharidique (GR2, 5mg.mL⁻¹ dans ADJ à 0,1%), jusqu'à ruissellement. Un fongicide de contact (spiroxamine, 1mL.L⁻¹) a été utilisé comme témoin positif. Les plantes ont été inoculées huit jours après traitement à l'aide de feuilles oïdiées, sporulantes. Sept jours post-infection, une estimation du nombre de foyer d'oïdium par feuille a été réalisée, puis les plantes ont été soumises à un second traitement, identique au premier. Ce dernier a eu pour objectif d'évaluer la capacité intrinsèque du produit à contenir la maladie et à révéler un éventuel effet curatif. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 2.

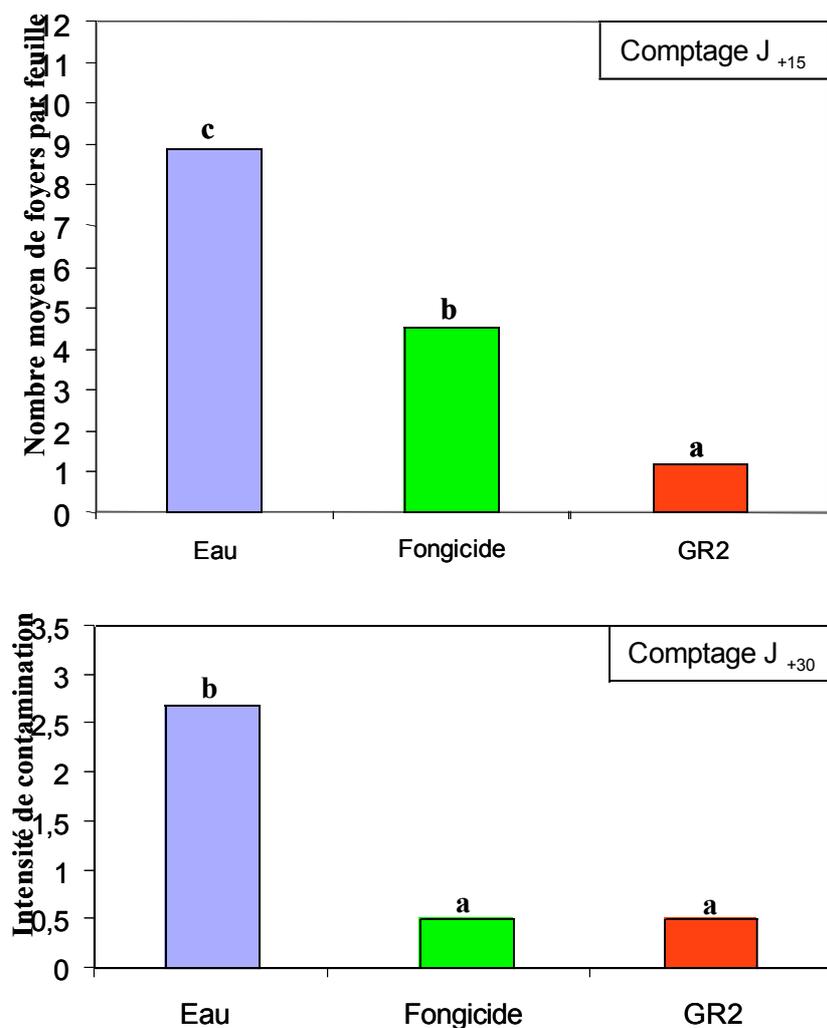


Figure 2 : efficacité de GR2 contre *Erysiphe necator* (oïdium) sur feuilles de vigne.

Nous montrons que **GR2** s'avère d'une **efficacité (80%) supérieure ou égale à un fongicide** de référence (spiroxamine, 1 mg.mL⁻¹) contre l'oïdium, **sur feuilles**, dans des conditions très favorables au parasite.

En 2006, cet essai a été doublé par la Chambre d'agriculture de Saône-et-Loire, dans le Mâconnais. **Dans les conditions d'application de la pratique viticole**, à la dose de 5 g.L⁻¹ (avec ADJ à 0,1%), et sous une pression de maladie moyenne, **GR2 procure une protection quasi-totale, comparable à celle du soufre**.

3.1.3. Etude du mode d'action de GR2 *in planta*, sur vigne, contre le mildiou :

Nous avons évalué l'effet de l'oligosaccharide GR2 sur (i) l'**induction de gènes de défense**, (ii) la **production de formes actives de l'oxygène** (H₂O₂), (iii) l'**activité PAL**, (iv) la **production de phytoalexines**, (v) la **colonisation des tissus foliaires** par l'agent pathogène et (vi) les **réactions de l'hôte induites** après l'inoculation de *Plasmopara viticola*. Dans chaque cas, nous avons comparé les réactions induites dans les plantes traitées par GR2 avec celles obtenues chez un hybride naturellement tolérant au mildiou, Solaris. Les résultats les plus marquants sont présentés dans les figures 3 à 6 et dans les tableaux 2 à 3.

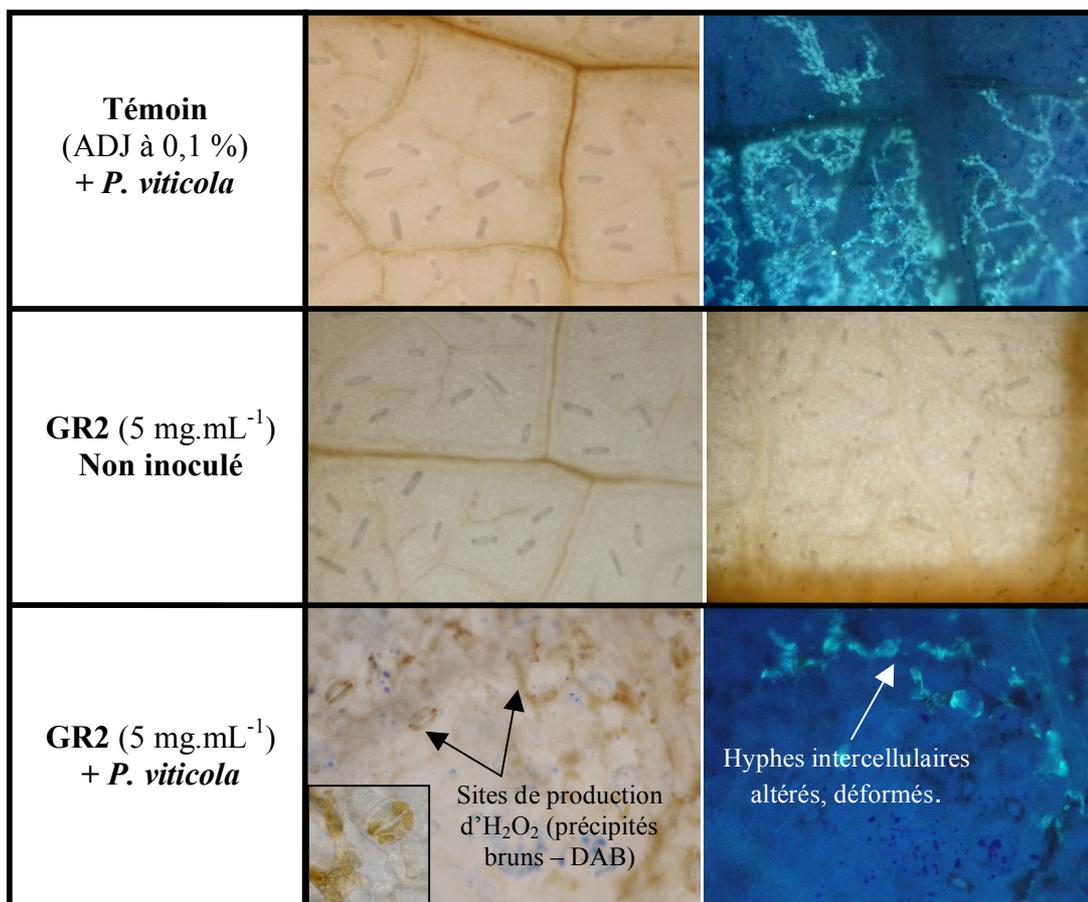


Figure 3 : Détection, *in planta*, de la production de H_2O_2 dans des boutures traitées ou non par GR2 puis inoculées ou non par *P. viticola*. Le DAB réagit avec H_2O_2 , aux sites de production et d'accumulation, pour former un précipité brun-orangé insoluble. Le parasite est repéré dans les zones correspondantes, après coloration au bleu d'aniline et observation par épifluorescence, sous filtre U.V.

Tableau 2 : Induction de la production de formes actives de l'oxygène (H_2O_2), *in planta*, en réponse aux traitements GR2, GR4 ou GR15 et/ou à l'inoculation du pathogène (*P. viticola*). Comparaison avec les réactions naturellement induites dans un hybride tolérant (Solaris). Il est intéressant de noter que **la capacité à induire l'accumulation de H_2O_2** dans les 48h **post-inoculation** semble **liée à l'efficacité de protection** contre le mildiou (cf GR2, GR4 et Solaris).

Traitement	Production de H_2O_2 <i>in planta</i> (méthode DAB)			Taux de protection moyen
	Sans inoculation	Après inoculation de <i>P. viticola</i>		
		24H post-inoculation	48H post-inoculation	
ADJ à 0,1%	-	-	-	0,0
GR2	-	+	++	80,3
GR4	+/-	+	++	57,0
GR15	++	+	+/-	0,0
Hybride Solaris	-	+	++	98,0

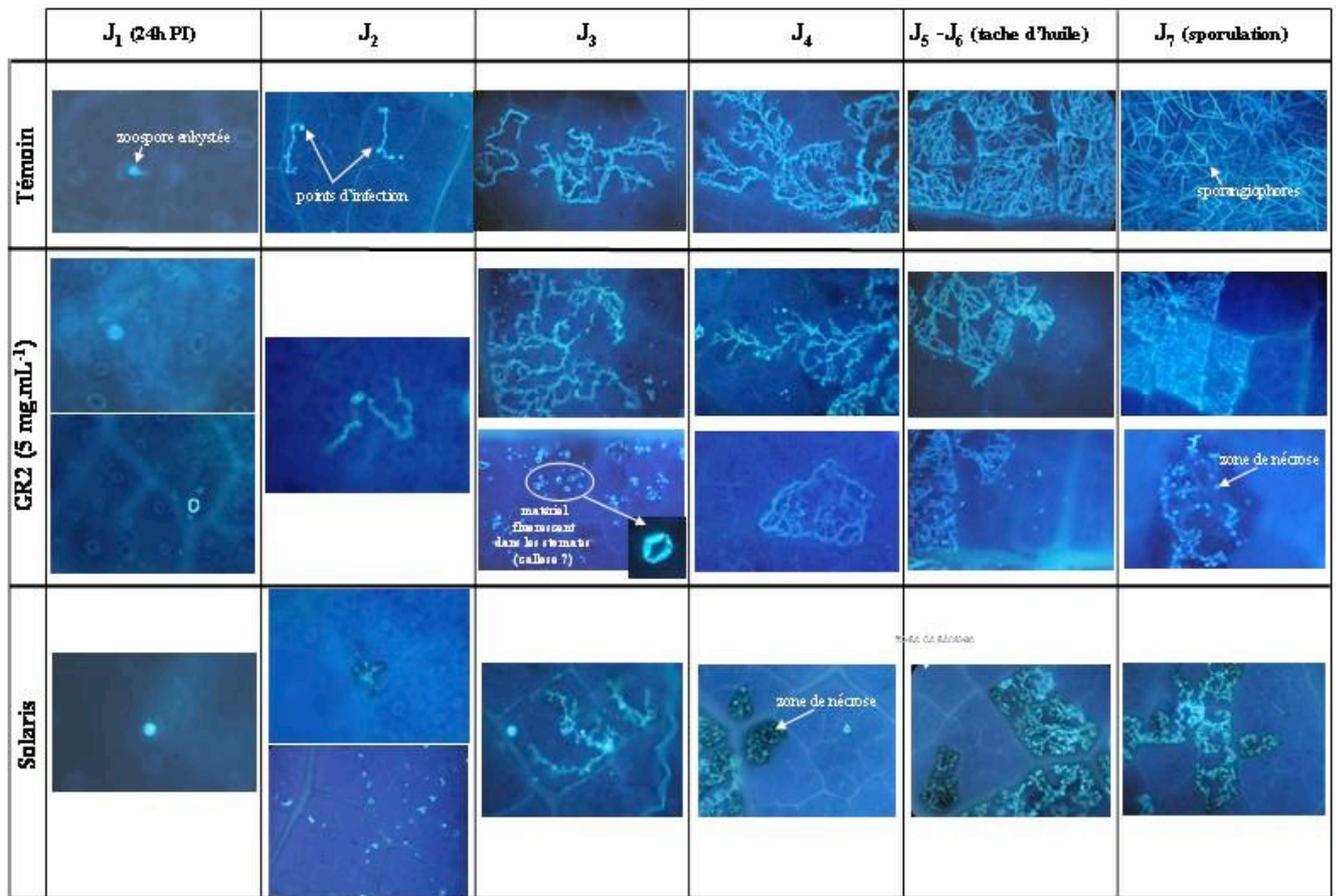


Figure 4 : Impact du traitement GR2 sur la colonisation tissulaire de *P. viticola* et comparaison avec les profils de colonisation obtenus dans un cépage naturellement tolérant au mildiou (Solaris). Observations réalisées en microscopie à épifluorescence (filtre U.V.), après coloration au bleu d’aniline. Dans ces conditions, les structures parasitaires fluorescent en bleu. Les photographies montrent que le **traitement GR2 réduit la colonisation interne du parasite** ; induit des réactions chez l’hôte, révélées par la présence d’un matériel fluorescent au niveau des stomates (callose ?) ; conduit ponctuellement à la dégénérescence du parasite (zones de nécrose) et bloque la sporulation de ce dernier (pourtant visible chez les témoins à 8J). De manière intéressante, les **profils de colonisation** obtenus dans les **tissus traités par GR2** sont **similaires** à ceux obtenus chez le cépage **Solaris**.

Tableau 3 : Estimation de l’intensité de la colonisation des tissus foliaires par *P. viticola*, au cours du temps post-inoculation (microscopie optique après coloration au bleu d’aniline). On confirme que **plus le niveau de résistance est important** (témoin < GR2 R1 < GR2 R2 < Solaris) et **plus le taux de colonisation interne des tissus foliaires par le parasite est faible**.

	Nombre de points d'infection	Nombre de secteurs colonisés	Pourcentage de surface colonisée (+/- écart-type)			
	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Témoins	5	5 (+/- 5)	11 (+/- 18)	58 (+/- 35)	98 (+/- 4)	97 (+/- 12)
GR2 R1	0,2	2 (+/- 5)	8 (+/- 10)	64 (+/- 17)	58 (+/- 38)	35 (+/- 43)
GR2 R2	0	1 (+/- 5)	1 (+/- 1)	16 (+/- 21)	12 (+/- 28)	16 (+/- 25)
Solaris	2	1 (+/- 1)	2 (+/- 3)	5 (+/- 7)	3 (+/- 5)	4 (+/- 7)

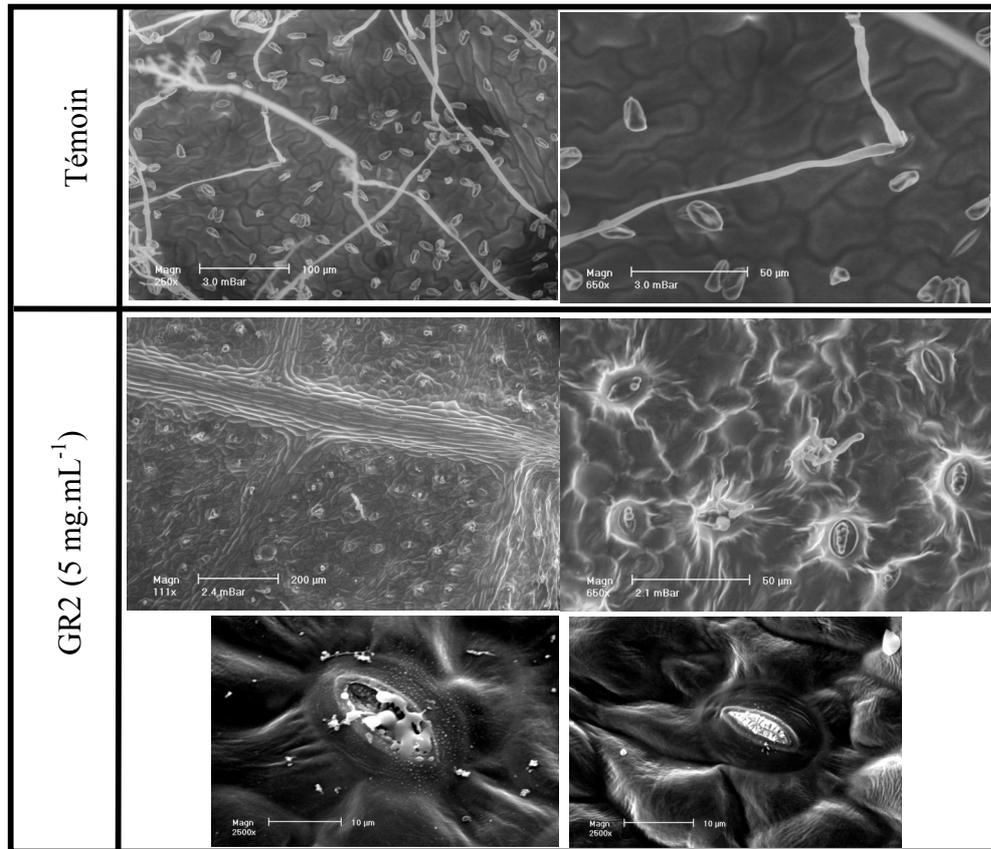


Figure 5 : Observation, en microscopie électronique à balayage, de la surface foliaire inférieure de plantes traitées ou non par GR2 et infectées par *P. viticola*. Les échantillons ont été prélevés 7 jours post-inoculation, après avoir déclenché la sporulation du parasite. Tandis que les plantes témoins présentent de nombreux sporangiophores, on observe chez les **plantes traitées par GR2** des **sporangiophores avortés**, ramifiés, qui ne conduisent **pas** à la production de **sporangies**. Dans certains cas, une substance amorphe, pouvant rappeler de la **callose**, **obstrue l'ouverture stomatique**. Ce faciès est hautement **similaire** à celui décrit chez différentes **espèces naturellement tolérantes** au mildiou (Dai *et al.*, 1995 ; Gindro *et al.*, 2003)

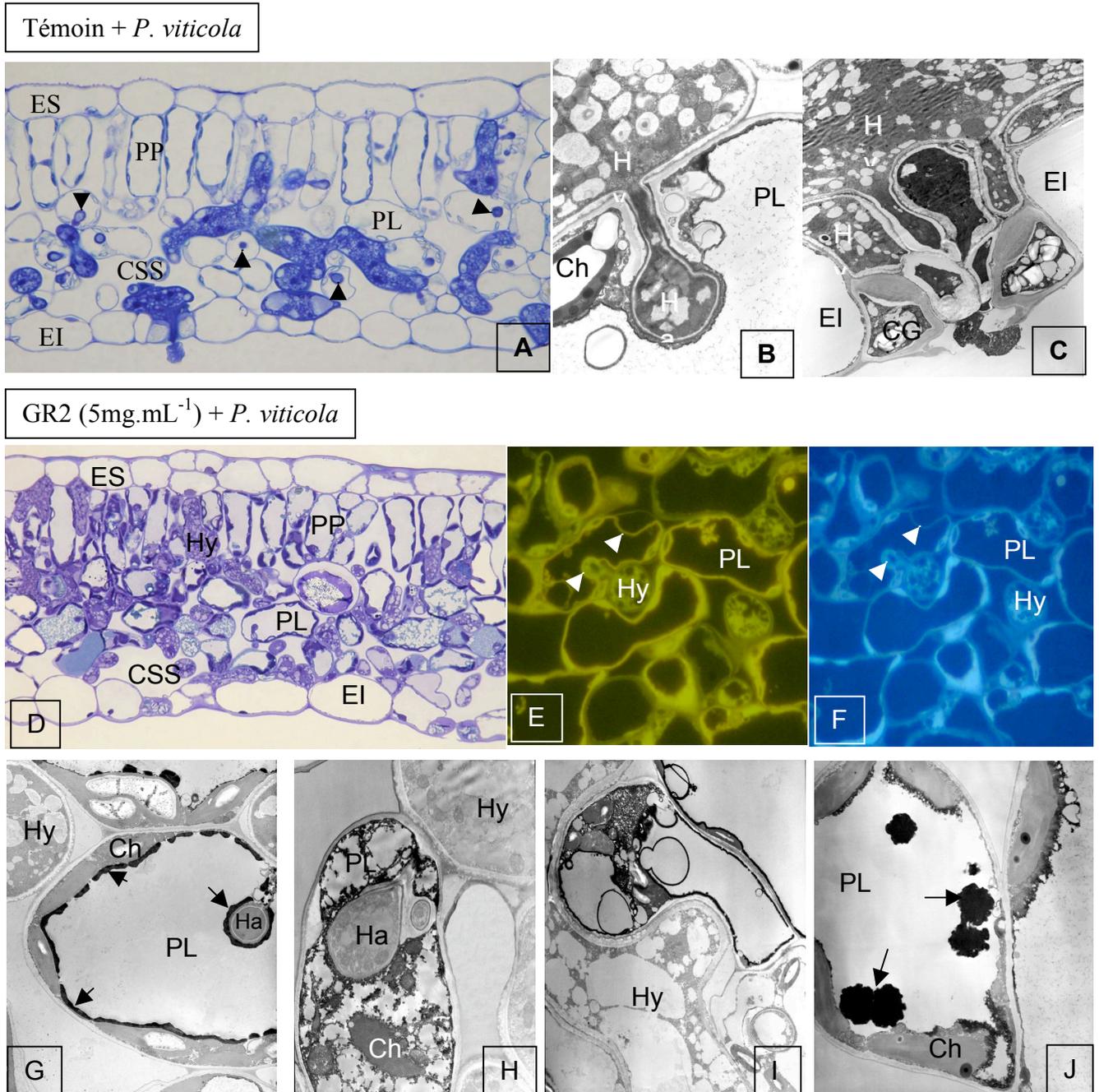


Figure 6 : Exemples de profils obtenus dans le cas de vignes (cv. Marselan) traitées ou non par GR2 et inoculées par *P. viticola* – Observations de coupes transversales 6J post-inoculation, soit 8J post-traitement, en microscopie photonique (A, D), à épifluorescence (E, F) ou électronique à transmission (B-C, G-J). EI : épiderme inférieur, ES : épiderme supérieur, PL : parenchyme lacuneux, PP : parenchyme palissadique, CG : cellule de garde, Ch : chloroplaste, CSS : chambre sous-stomatique, Hy : hyphe intercellulaire, Ha : haustorium. Dans le cas de plantes témoins (A-C), nous n’observons aucune réaction de défense de la plante en réponse à la colonisation parasitaire. Les cellules infectées présentent un cytoplasme et une vacuole intègres (B), tandis que les chambres sous-stomatiques sont remplies d’hyphes (C) et que le parasite est prêt à sporuler. Nous montrons en revanche que dans les **plantes traitées par GR2 et infectées par *P. viticola*** (D-J), de **fortes réactions de défense** sont induites. Ces dernières sont détectées par (i) la présence d’une couche hautement dense aux électrons (G, flèches) et fluorescente sous U.V. (F, flèches) **englobant les haustoria**, vraisemblablement enrichie en **composés phénoliques** ; (ii) la **dégénérescence des cellules infectées**, présentant des agrégations cytoplasmiques (H) ou une **forte vacuolisation (I) similaire** à celle observée dans le cas d’une **réaction incompatible** ou (iii) la présence de globules hautement denses aux électrons (J, flèches), certainement riches en composés phénoliques et aux propriétés fongitoxiques.

Nos résultats montrent que **GR2, appliqué seul, n'induit pas de réaction forte chez la plante**. En revanche, cette molécule présente la **capacité de sensibiliser la vigne à répondre plus rapidement et plus efficacement à l'attaque du parasite**, en induisant notamment chez l'hôte la production de produits toxiques pour l'agresseur (H₂O₂) et l'élaboration de barrières physiques (renforcements pariétaux) et chimiques (production de composés phénoliques). Ainsi, GR2 agirait comme un **potentialisateur** (Conrath *et al.*, 2002) dans le pathosystème **vigne-mildiou**, ce qui est certainement un atout pour l'**économie du métabolisme de la plante** (van Hulsten *et al.*, 2006). Il semblerait en outre que potentialisation et induction de résistance aillent de paire. Enfin, il est particulièrement intéressant de noter que **GR2 induit, chez la vigne, des réactions semblables à celles naturellement observées, en réponse à *P. viticola*, chez des espèces tolérantes au mildiou**.

Ces résultats font l'objet d'une publication actuellement en cours de rédaction (Trouvelot *et al.*, 2006 – cf § 1.4). Par ailleurs, ils ont pu être valorisés lors d'une présentation orale dans un congrès international (cf § 1.5).

3.1.4. Bibliographie :

- **Conrath, U., C. M. Pieterse and B. Mauch-Mani.** 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7 (5):210-6.
- **Dai, G.H., L. Mondolot-Cosson and D. Boubals.** 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46,177-188.
- **Gindro, K., R. Pezet and O. Viret.** 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41, 9, 846-853.
- **Klarzynski, O. et B. Fritig.** 2001. Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la Vie / Life sciences* 324:953-963.
- **Reuveni, M.** 1998. Relationships between leaf age, peroxidase and beta-1,3-glucanase activity, and resistance to downy mildew in grapevines. *Journal of Phytopathology* 146:525-530.
- **Reuveni, M., T. Zahavi and Y. Cohen.** 2001. Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with beta-aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica* 29 (2):125-133.
- **Trouvelot S., A.-L. Varnier, L. Mercier, M. Allègre, F. Baillieul, C. Arnould, V. Gianinazzi-Pearson, A. Pugin and X. Daire.** A β-1,3 glucan sulfate potentiates defense response and induces resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine (en cours de rédaction)
- **van Hulsten, M., M. Pelsler, L. C. van Loon, C. M. Pieterse and J. Ton.** 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 103 (14):5602-7.

3.2 Etude du pouvoir protecteur d'un champignon du sol : la souche fongique Fo47 (*Fusarium oxysporum*) (cf publications 2, 5 et 6 - § 1.4).

2002-2003 : Comparaison des réactions de défense induites chez la plante en réponse à la souche de *Fusarium oxysporum* non pathogène Fo47 ou à deux de ses mutants ayant perdu leur capacité protectrice. (poste d'ATER) ; UMR Université de Bourgogne – INRA. Microbiologie et Géochimie des Sols.

1999 - 2002 : Etude du déterminisme génétique du pouvoir antagoniste du champignon filamenteux *Fusarium oxysporum* Fo47. (thèse de doctorat) ; UMR Université de Bourgogne – INRA. Biochimie Biologie Cellulaire et Ecologie des Interactions Plante / Microorganisme.

Directeur de thèse : Claude Alabouvette ; Co-encadrant : Chantal Olivain

Mots clés : **Champignons du sol**, fusariose vasculaire, **pouvoir antagoniste**, mutagenèse insertionnelle, réactions précoces de défense, **cultures cellulaires** et **microbiologiques**.

3.1.1 Contexte scientifique et objectifs:

La **rhizosphère** des plantes est le lieu d'une intense **compétition entre micro-organismes**. De cette confrontation dépendra le bon développement de la plante. Certains micro-organismes non pathogènes se développent autour des racines et limitent les attaques des agents parasites soit directement par antagonisme ou indirectement par stimulation des défenses naturelles des plantes.

Fusarium oxysporum est un champignon **phytopathogène**, agent de trachéomycose, capable d'infecter un grand nombre d'espèces végétales. La **lutte contre les fusarioses vasculaires** peut être menée en utilisant des souches de *F. oxysporum* **non pathogènes** sélectionnées pour leur **activité antagoniste** contre les formes spéciales pathogènes (Alabouvette *et al.*, 1998). Certains mécanismes de l'antagonisme ont pu être identifiés (compétition trophique, compétition pour les sites d'infection, induction de résistance) cependant rien n'est connu quant aux déterminants génétiques impliqués dans cette activité. Afin de rechercher les mécanismes de **bio-contrôle** par lesquels la souche non pathogène Fo47, isolée du sol Châteaurenard (naturellement résistant à la fusariose vasculaire), est efficace, nous avons adopté une **approche de mutagenèse** pour **générer des mutants altérés dans leur activité antagoniste**. N'ayant pas *d'a priori* sur les gènes qui peuvent être impliqués dans cette activité, nous avons choisi une stratégie de mutagenèse aléatoire : la mutagenèse insertionnelle par **transposon**. Pour ce faire, nous avons choisi l'élément transposable *Fot1* car il présentait l'avantage d'être naturellement absent chez Fo47. De plus, ses capacités à s'exciser et à se réinsérer fréquemment à différents sites distribués à travers le génome avaient été préalablement démontrées, prouvant son utilité comme outil de mutagenèse (Migheli *et al.*, 1999).

3.1.2 Obtention de mutants :

A partir de mille cultures, quatre-vingt dix souches dans lesquelles *Fot1* a transposé ont été obtenues et testées pour leur capacité à protéger contre la forme pathogène du lin *F. oxysporum* f. sp. *lini*. Les résultats montrent que **18% de ces souches**, soit 16 mutants, sont **affectés dans leur aptitude protectrice**, aussi bien positivement (plus protecteurs que Fo47) que négativement (moins protecteurs) (Figure 1). Parmi ces derniers, **certaines semblent avoir quasiment perdu leur activité protectrice**, quelque soit le ratio auquel ils sont introduits (mutants 94 et 505). Notons aussi qu'**aucun mutant n'est devenu pathogène** et que ce phénotype est stable puisque éprouvé sur plusieurs années et maintenu sur un autre cultivar de lin et sur une autre espèce végétale (melon). A notre connaissance, c'est la première fois que la technique de mutagenèse insertionnelle par transposon est utilisée avec succès, chez un champignon filamenteux, pour l'obtention de mutants affectés dans leur capacité protectrice.

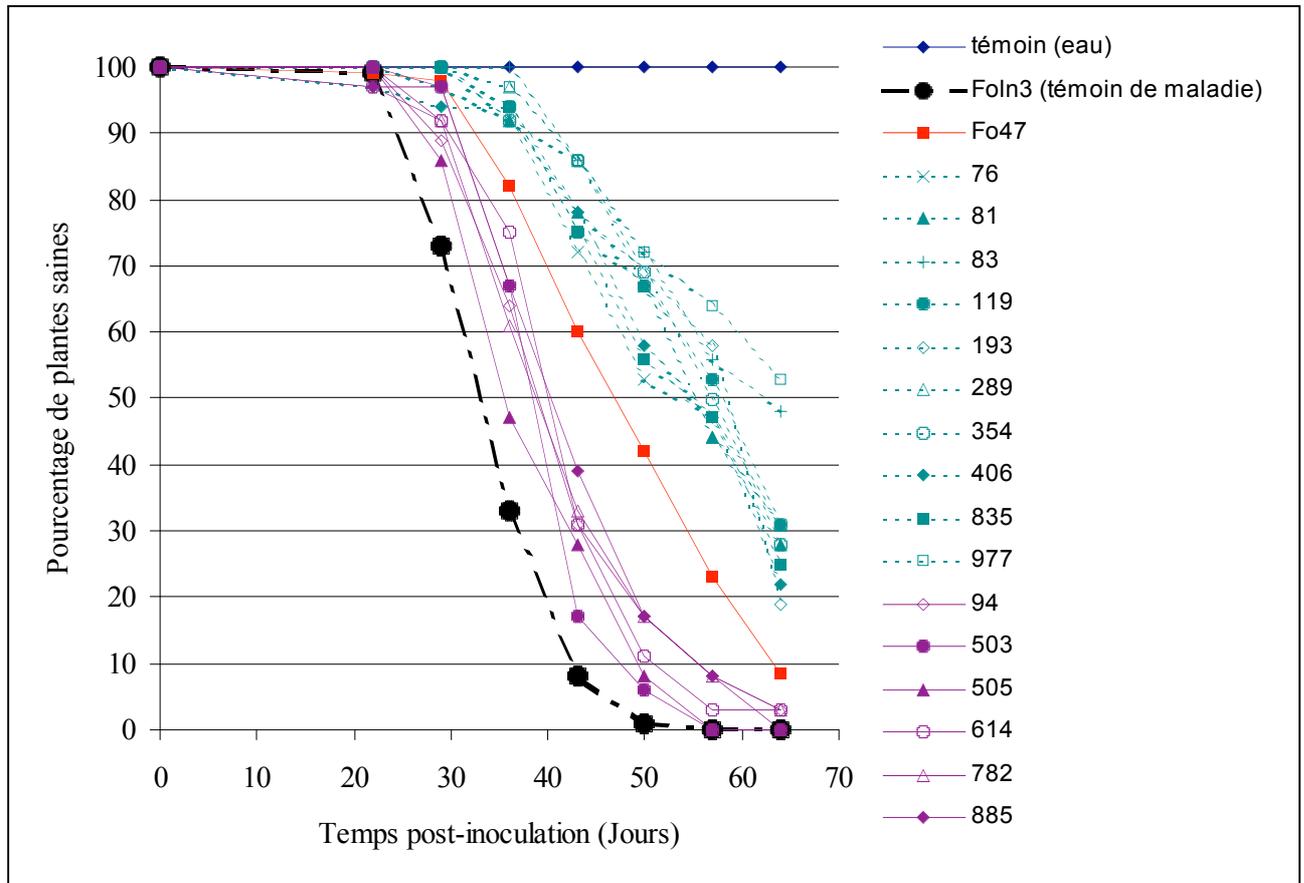


Figure 1 : Capacité des 16 mutants indépendants, générés à partir de la souche non pathogène Fo47, à protéger contre la fusariose vasculaire du Lin en serre. Les données représentent le pourcentage moyen de trois répétitions de 12 plantes. Seuls les mutants significativement affectés, comparativement à la souche sauvage, sont représentés sur ce graphique.

3.1.3 Caractérisation moléculaire des mutants :

La caractérisation moléculaire de ces souches a confirmé l'**excision** de *Fot1* à partir de la **matrice *niaD* (nitrate réductase)** et sa **réinsertion à des positions génomiques différentes** dans la majorité des cas. Afin d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans l'aptitude antagoniste, les séquences flanquant l'élément transposé ont été, pour la plupart, amplifiées par PCR-inverse, clonées et, pour certaines, séquencées. Une **recherche de similitude** a ensuite été conduite sur les séquences obtenues en utilisant les bases de données disponibles et le programme **BLAST**. Aucune similarité forte avec des séquences connues n'a été observée.

Dans l'optique de séquencer des fragments de plus grande taille, plus riches en information, nous avons réalisé une **banque génomique** en phage λ de la souche sauvage Fo47.

3.1.4 Analyse et comparaison des profils polypeptiques :

Les répercussions transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et traductionnelles que peuvent générer les mutations responsables des phénotypes mutants ont été recherchées à l'aide d'analyses électrophorétiques mono et bi-dimensionnelles réalisées sur des protéines totales exprimées de manière constitutive et extraites de mycélium lyophilisé. Ces études ont révélé, **chez les deux mutants**, l'**existence de spots différenciellement exprimés comparativement à Fo47**. Quelques spots ont été analysés par spectrométrie de masse de type LC-MS/MS à trappe ionique à la Plate-forme protéomique du Moulon (réseau protéome vert). Malheureusement, en absence de données relatives à *F. oxysporum* dans les banques de données disponibles et compte-tenu du nombre restreint d'accessions dans les bases de données génomiques et protéiques pour les champignons filamenteux, nous n'avons obtenu aucune identification.

3.1.5 Caractérisation phénotypique :

Dans un premier temps, nous avons étudié la **capacité saprophyte des mutants : croissance sur milieu minimal, croissance et survie dans le sol, aptitude à concurrencer un agent pathogène dans le sol**. Cette étude a révélé que les mutants présentent des caractéristiques similaires à celles de Fo47. De manière plus surprenante, il semblerait que le mutant 94, qui a perdu sa capacité à protéger, soit plus compétitif en sol désinfecté que la souche sauvage Fo47. Rappelons cependant que l'efficacité protectrice de Fo47 n'a pas seulement été corrélée à l'aptitude saprophyte mais aussi à la capacité à induire la résistance de la plante hôte (Fuchs *et al.*, 1997). Cet argument justifie la suite de notre travail qui s'est portée sur l'étude des interactions entre la plante et les mutants de Fo47, au niveau histologique et biochimique.

3.1.6 Caractérisation cytologique, dans l'interaction avec la racine de Lin :

De nombreux arguments présentés notamment par Olivain ou Benhamou, insistent sur les **événements qui se déroulent durant la phase d'interaction entre le champignon et la plante hôte**. En effet, Fo47 pénètre dans la racine où il induit des réactions de défense. La perte de l'aptitude protectrice du mutant 94 pourrait donc s'expliquer par un défaut de pénétration et d'induction de réactions de défense. Nous avons entrepris l'**étude de l'aptitude des mutants 83 (plus protecteur que Fo47) et 94 (moins protecteur que Fo47) à coloniser activement la racine de lin**. Le profil de colonisation des racines de lin par la souche Fo47 n'ayant jamais été décrit, nous avons dans un premier temps caractérisé la **localisation *in situ*** de la souche non pathogène Fo47, 6 jours après son inoculation. Cette souche colonise activement la surface racinaire et n'est jamais retrouvée dans les vaisseaux de xylème. **Aux sites de pénétration**, les hyphes induisent des **modifications ultra-structurales** caractérisées par l'**élaboration de dépôts pariétaux et de papilles d'occlusion**. Les mutants sont tous les deux capables de coloniser la racine de lin. Toutefois, si le mutant 83 présente un profil de colonisation tout à fait similaire à celui de la souche sauvage, **le mutant 94 induit en revanche chez l'hôte des réactions de défense beaucoup plus importantes que celles observées durant l'interaction avec Fo47**. Les racines de

lin colonisées par le mutant 94 présentent des cellules collapsées au niveau de l'hypoderme et du péricycle ce qui leur confère un aspect déformé.

3.1.7 Etude des réactions de défense induites de manière précoce :

Les réactions de défense observées dans la racine résultant nécessairement de phénomènes précoces survenant lors des toutes premières phases de l'interaction entre l'hôte et le parasite, nous avons alors entrepris l'étude de l'expression de telles réactions. A notre connaissance, aucun travail n'avait été consacré jusqu'alors à l'étude des réactions précoces induites lors de l'interaction entre une espèce végétale et des souches pathogènes ou non pathogènes de *F. oxysporum*. C'est pourquoi nous avons débuté cette étude par la **comparaison des événements précoces observés lors de l'interaction entre des cellules de Lin et la souche pathogène *F. oxysporum* f. sp. *lini* ou la souche non pathogène Fo47.**

En regard de la littérature disponible pour d'autres modèles hôte/microorganisme, nous avons choisi de **confronter des suspensions cellulaires et des spores de champignon**. Ainsi, nous avons comparé les réactions induites sur des suspensions cellulaires de lin en réponse à l'inoculation de la souche pathogène Folin3 ou de la souche non pathogène Fo47 pour : (i) la **production de FAO**, (ii) l'**influx de calcium**, (iii) la **variation de pH extracellulaire** et (iv) la **viabilité cellulaire**. Toutes ces réactions ont été choisies car généralement décrites comme permettant de **discriminer une réaction compatible d'une réaction incompatible**. Appliquée à notre modèle d'étude, l'analyse des réactions précoces des cellules de lin en interaction avec Fo47 et Folin3 permet effectivement de distinguer la réaction non pathogène de la réaction compatible. Dans le cas de la réaction non pathogène, la plante réagit en déclenchant une cascade d'événements qui conduit à la résistance. Ces événements précoces étant caractéristiques d'une réaction incompatible, il est intéressant de s'attacher à déterminer s'ils sont impliqués, directement ou indirectement, dans la capacité protectrice de Fo47.

3.1.8 L'induction de résistance systémique : une composante essentielle dans le pouvoir protecteur de Fo47 ?

Afin de poursuivre l'**analyse du déterminisme du pouvoir protecteur de Fo47**, j'ai, lors de mon travail d'ATER, entrepris la **comparaison de deux mutants ayant perdu leur capacité protectrice** (94 et 505). J'ai comparé : (i) leurs **profils de colonisation des racines** de lin suivant une cinétique comprise entre 24h et 6j après l'inoculation (ii) les **réactions de défense induites chez les racines** de lin en réponse à cette colonisation par l'étude de la fluorescence des composés phénoliques et (iii) les **réactions de défense induites précocement sur suspensions cellulaires** de lin : influx calcique, production de formes actives de l'oxygène, variation du pH extracellulaire et viabilité cellulaire.

Les résultats obtenus montrent que **les tests évaluant les réactions de défense précoces** (production de FAO et variation de pH) **ne sont pas**, à eux seuls, **de bons indicateurs du pouvoir protecteur**. En effet, notre travail prouve qu'il n'est pas possible, par ce biais, de discriminer efficacement différentes souches non pathogènes à pouvoir protecteur plus ou moins efficace.

En revanche, les **études cytologiques** révèlent des différences intéressantes entre les mutants et la souche sauvage. Les profils de colonisation racinaire (localisation *in situ*) pour Fo47 et les mutants 94 et 505 (perte de pouvoir protecteur) ont été comparés à 48 heures et à 5 jours post-inoculation. Dans le cas de la **souche sauvage**, la **colonisation est essentiellement de surface**. En observation sous U.V., on note très tôt (48H) la **mise en place de barrières physiques (lignine)** synthétisées par la plante en réponse au champignon. A 5 jours post-inoculation, le champignon a poursuivi sa progression dans la racine de Lin mais la colonisation reste limitée. Les barrières physiques mises en place par la plante étant moins visibles qu'à 48 heures, il est envisageable que d'autres mécanismes soient impliqués (protéines PR, phytoalexines par exemple). Dans le cas des **mutants** 94 et 505 on observe une **colonisation plus étendue**. A 48H post-inoculation, l'interaction racine de lin/mutant 94 présente une spécificité : la présence de zones nécrotiques, fortement fluorescentes sous U.V., révélant la présence de réactions de défense (flavonoïdes). Cinq

jours post-inoculation, les mutants ont pu coloniser le cortex. On note aussi la **présence de zones de nécroses**, ponctuelles, dans lesquelles une **profonde désorganisation cellulaire** est observée. Le mutant 505, bien que non pathogène, est apte à atteindre le cylindre central et les vaisseaux, processus jusque là reconnu comme propre aux souches pathogènes. Ainsi, **les mutants ayant perdu leur activité protectrice, semblent plus nécrotrophes et nécrogènes que la souche sauvage**. Ces observations sont difficiles à interpréter. Si l'on accepte l'hypothèse selon laquelle la protection résulte d'un mécanisme de reconnaissance précoce entraînant une mort cellulaire limitée et une induction systémique de résistance, il faut admettre que **le potentiel nécrogène de ces deux mutants ne permet pas d'induire une résistance de nature systémique**. Tout se passe comme si la **mort cellulaire** intervenait **trop tardivement** et **trop intensément** pour induire les mécanismes de défense.

3.1.9 Bibliographie :

- **Alabouvette, C., B. Schippers, P. Lemanceau and P. A. H. M. Bakker.** 1998. Biological control of fusarium wilts: toward development of commercial products. In: Plant-microbe interactions and biological control. Boland G.J. and K. L.D., eds. New-York - Basel - Hong-Kong, Marcel Dekker, Inc. 2: 15-36.
- **Benhamou, N. and C. Garand.** 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathology* 91 (8): 730-740.
- **Fuchs, J.-G., Y. Moëgne-Loccoz and G. Défago.** 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt in tomato. *Plant Disease* 81: 492-496.
- **Migheli, Q., R. Laugé, J. M. Davière, C. Gerlinger, F. Kaper, T. Langin and M. J. Daboussi.** 1999. Transposition of the autonomous *Fot1* element in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *Genetics* 151.
- **Olivain C., S. Trouvelot, M.-N. Binet, C. Cordier, A. Pugin and C. Alabouvette.** 2003. Comparison of colonisation of flax roots and early physiological responses of flax cells induced by pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9, 5453-5462.

3.2 Influence de la mycorhization sur la santé des porte-greffes de vigne : perspectives d'application à l'acclimatation des vitro-plants. (cf publication 3 - § 1.4)

1998 : Analyse moléculaire d'une communauté de champignons endomycorhizogènes reconstruite en microcosme et appliquée à la vigne. (DSER, 1 an)

1997 : Caractérisation, à l'aide de sondes moléculaires, des Glomales dans le sol, les racines et la rhizosphère de la vigne micropropagée. (stage de DEA, 6 mois)

Laboratoire d'accueil : Phytoparasitologie - INRA, DIJON

Encadrants : Pr. Silvio Gianinazzi et Dr. Diederik van Tuinen

Mots clés : **Vigne**, Endomycorhizes à arbuscules, **communautés fongiques**, **compartimentation tellurique**, PCR, hybridation *in situ*.

3.2.1 Contexte scientifique et objectifs :

La vigne est l'une des plantes les plus cultivées à l'échelle mondiale ; elle représente, en France, une activité de quelques milliards d'Euros dont le quart est assuré à l'exportation. **Plusieurs maladies graves ont des conséquences sur la productivité et la qualité des vins, mais aussi sur la survie des cépages.** Actuellement, les viticulteurs utilisent essentiellement la **lutte chimique, raisonnée** par l'emploi de modèles épidémiologiques apportant une aide à la décision. Par ailleurs, on observe un intérêt renouvelé pour les **méthodes alternatives** qui font appel à la prophylaxie, à l'emploi d'antagonistes microbiens, d'insectes auxiliaires, aux stimulations des réactions de défenses naturelles de la plante ou l'obtention de porte-greffes transgéniques résistants aux ravageurs.

La vigne est connue pour former des associations symbiotiques telles que les endomycorhizes avec certains **champignons telluriques** (ordre des glomales). Dans cette association, le champignon forme des structures à l'intérieur des racines et développe un vaste réseau de mycélium dans le sol.

Les **endomycorhizes** arbusculaires sont ainsi **impliquées dans plusieurs processus clés de la vie de la plante** (développement, nutrition minérale, protection vis à vis des stress abiotiques et biotiques) **et de l'écosystème** (flux des éléments nutritifs et conservation de la structure des sols). Ces effets bénéfiques sur la plante hôte rendent ces champignons intéressants aussi bien du point de vue agronomique qu'écologique. Ainsi, **l'utilisation rationnelle des champignons endomycorhizogènes en agriculture implique de savoir gérer les populations fongiques indigènes ou introduites (inoculation) dans le sol.**

Il est connu que **ces champignons améliorent la croissance de la vigne** en sol désinfecté et en conditions contrôlées, notamment en modifiant l'architecture racinaire de la plante (Schellenbaum *et al.* 1991). La mycorhize provoque une ramification (dichotomisation) accrue du système racinaire qui, conjointement au développement des hyphes extraradiculaires, permet une **meilleure exploitation des sols. La mycorhization contrôlée de jeunes plantes constitue un moyen d'améliorer le développement et la résistance aux stress d'origine biotique ou abiotique des porte-greffes de vigne.**

Les **objectifs** de mon travail étaient de :

- (i) vérifier si une plantule de vigne pré-mycorhizée *in vitro* maintenait sa mycorhization dans un sol colonisé par une microflore fongique ;

- (ii) déterminer l'influence éventuelle de la nature de la microflore fongique du sol sur la colonisation racinaire par les champignons endomycorhizogènes.
- (iii) déterminer l'impact de la mycorhization sur le développement des porte-greffes.

3.2.2 Vigne et mycorhization : la combinaison de souches pour une meilleure efficacité.

Dans cette étude, nous avons testé **plusieurs combinaisons de champignons mycorhiziens, appliquées immédiatement en sortie d'*in vitro***.

L'originalité de ce travail a été de **réaliser le suivi de tels champignons dans les différents compartiments du développement mycélien : sol, rhizosphère et racine**. Pour ce faire, nous avons utilisé une **approche moléculaire**, basée sur l'utilisation d'**amorces taxon-discriminantes** développées par le laboratoire (van Tuinen *et al.* 1997). Par ce biais, il nous a été permis de **révéler la diversité fongique** (glomales) dans chaque compartiment. **Parallèlement, nous avons étudié la progression de la mycorhization dans les racines** de vigne suivant une cinétique de prélèvement entre 2 et 8 semaines post-inoculation.

Concernant l'étude de la mycorhization des racines de vigne, les résultats obtenus ont été regroupés dans la figure 2. Ils montrent que seule la **pré-inoculation par *G. intraradices*** (courbe rouge) est significativement **favorable à l'établissement de la mycorhization chez la vigne**.

L'approche moléculaire a permis de montrer que **les champignons endomycorhizogènes à arbuscules préfèrent se développer en communauté** et qu'ils persistent au sein de la plante symbiote tout en se propageant au niveau tellurique. Toutefois, **certaines souches se maintiennent mieux que d'autres** après transplantation, **suggérant une aptitude à la compétition plus prononcée avec la flore indigène**. Ainsi, ***G. intraradices* pourrait représenter l'espèce déterminante pour l'endomycorhization de la vigne** puisque c'est lui qui est le plus fréquemment détecté, quelle que soit la combinaison fongique appliquée.

Ce travail avait une finalité appliquée. En effet, l'une des perspectives est **d'utiliser la combinaison de champignons mycorhiziens la plus efficace (*Glomus intraradices* puis *Glomus mosseae* & *Scutellospora castanea*) pour faciliter l'acclimatation et favoriser la rusticité des vitroplants de porte-greffes de vigne**. Cette étude (Trouvelot 1997 et 1998), en microcosme, montre qu'un champignon comme ***Glomus intraradices* est un candidat idéal** car il colonise très bien le porte-greffe dès sa sortie d'*in-vitro* et favorise sa croissance (figure 3). Il est non seulement capable de se maintenir dans la plante symbiote (lui apportant ainsi des éléments nutritifs indispensables à sa survie) mais aussi de se développer dans la rhizosphère, pour y créer un véritable réseau mycélien permettant une meilleure exploitation du sol.

Ces résultats sont étayés par ceux obtenus lors d'une **collaboration** réalisée avec une doctorante de **Genève** (Catherine Calantzis). Par des méthodes de biophysique, basées sur la quantification de l'émission de fluorescence de la chlorophylle a, il a été possible **d'évaluer l'état de stress des plantules de vignes** **subit lors de la transplantation et durant le processus de mycorhization**. Cette étude révèle que (i) il faut attendre la 8^{ème} semaine d'inoculation pour observer un bénéfice pour la plante (augmentation de la biomasse et de la performance photosynthétique) ; (ii) une corrélation peut être établie entre la vitesse de colonisation du champignon et le stress résultant sur la plante et (iii) il est possible que la clé de la protection des plantes par la mycorhization résulte d'une meilleure gestion de l'activité photosynthétique.

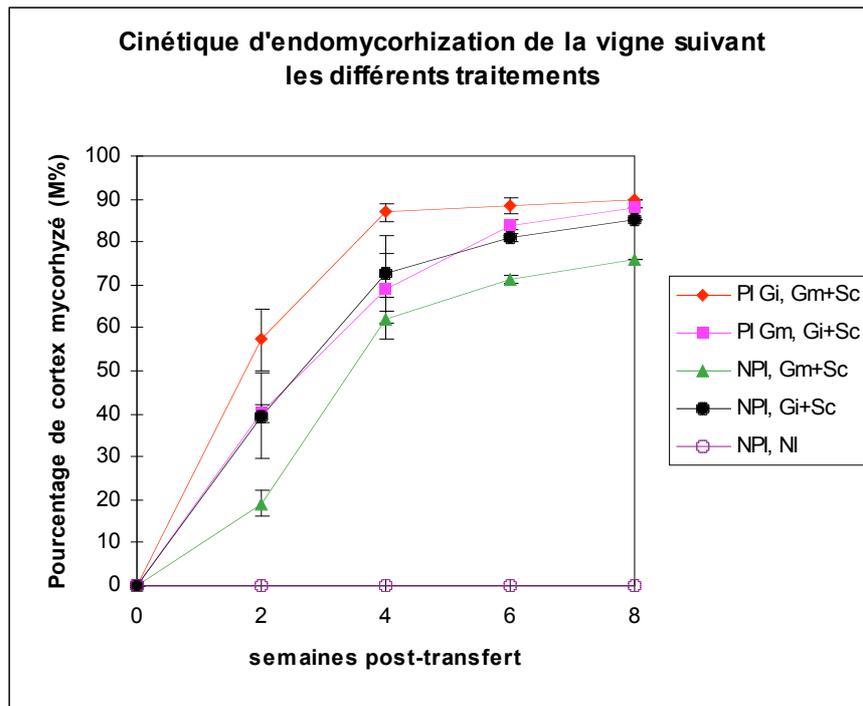


Figure 2 : Cinétique d'endomycorhization de la vigne suivant les différentes combinaisons fongiques étudiées. Les barres représentent les intervalles de confiance. PI : plants pré-inoculés, NPI : plants non pré-inoculés. Gi : *Glomus intraradices* ; Gm : *Glomus mosseae* ; Sc : *Scutellospora castanea*.

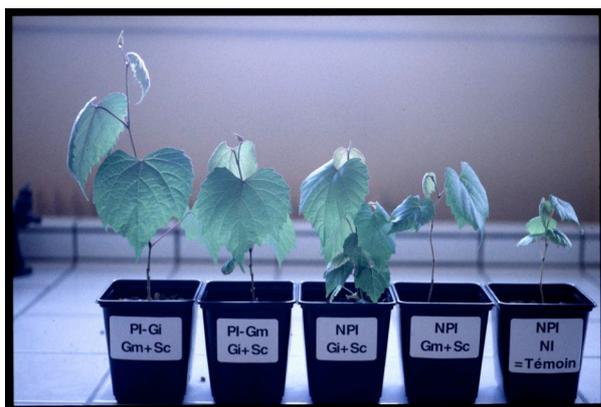


Figure 3 : Comparaison des développements aériens et racinaires des porte-greffes de vigne (SO₄102) 6 semaines après la pré-inoculation. PI : plants pré-inoculés, NPI : plants non pré-inoculés. Gi : *Glomus intraradices* ; Gm : *Glomus mosseae* ; Sc : *Scutellospora castanea*.

3.2.3 Bibliographie.

- **Schellenbaum L., G. Berta, F. Ravolanirina, B. Tisserant, S. Gianinazzi and A.H. Fitter** (1991). Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.) *Annals of Botany*, 68, 135-141.
- **Trouvelot S.** (1997). Caractérisation, à l'aide de sondes moléculaires, des glomales dans le sol, les racines et la rhizosphère de la vigne micropropagée ; D.E.A., Université de Bourgogne, 25 pages.
- **Trouvelot S.** (1998). D.S.E.R., Analyse moléculaire d'une communauté de champignons endomycorhizogènes appliquée à la vigne et reconstruite en microcosme, Université de Bourgogne, 31 pages.
- **Van Tuinen D., E. Jacquot, B. Zhao and Gianinazzi-Pearson V.** (1998). Characterisation of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, 7, 879-887.

3.3 Etude de l'impact d'amendements sidérurgiques sur les communautés microbiennes symbiotiques.

3.3.1 Contexte scientifique :

Les **Amendements Thomas** sont élaborés par le **Groupe Usinor**, dans les aciéries de Sollac. Il s'agit de **scories de déphosphorylation**, co-produites lors de la transformation de la fonte en acier. Elles sont **riches en chaux et silicate de chaux, magnésie, phosphore et oligo-éléments**. Ce sont des Amendements calciques sidérurgiques, commercialisés par la société SNST Scories France. Avec une valeur neutralisante élevée, le relèvement du pH du sol est rapide et soutenu, grâce à l'utilisation de la chaux libre relayée par celle des silicates. De plus, ces amendements revendiquent une **fertilisation du sol** dite « efficace » par la **présence de phosphore**, sous forme de phospho-silicate de chaux. Ce dernier aurait un effet immédiat, en sols acides ou neutres, aussi bon que celui des formes chimiques les plus solubles. En outre, sa **biodisponibilité** resterait supérieure dans le temps. Toutefois, **aucune étude n'avait testé l'impact de ces fertilisants sur la microflore indigène des sols traités**.

3.3.2 Protocole expérimental :

Pour aborder cette problématique, j'ai entrepris un travail d'équipe avec un doctorant de l'INRA de Dijon (Philippe Duquenne), sous la direction conjointe de Gérard Catroux (directeur du Centre de Microbiologie des Sols de Dijon) et Silvio Gianinazzi.

Trois sols distincts de propriétés physico-chimiques différentes ont été testés. Ces sols provenaient par ailleurs de régions différentes (Aquitaine, Bretagne et Haute-Marne) de manière à couvrir des **zones géographiques diverses**. Les sols, **tamisés à l'état frais** de manière à ne conserver que la fraction en dessous de 3.15 mm, ont été **traités** (ou non) **de manière comparative** par apport d'**Amendement Thomas** ou d'un amendement phosphate classique : le « **super-phosphate** ». De plus, dans le cas du sol breton, l'impact d'une adjonction de **lisier** a été évalué.

Nous avons mesuré cinq caractéristiques de la microflore indigène du sol représentative de son efficacité : la **respirométrie**, la **minéralisation de l'azote dans le sol**, l'**évolution de la biomasse microbienne dans le sol**, la **capacité à noduler** et à **mycorhizer les légumineuses** (trèfle, pois, haricot nain).

Les résultats obtenus, **confidentiels**, n'ont pu être publiés mais ont fait l'objet d'un **rapport à diffusion restreinte** (Trouvelot et Duquenne, 1998 – cf § 1.4).

3.4. Encadrement et formation de stagiaires et de techniciens :

Dans le cadre de mon DSER, j'ai eu l'opportunité de former :

- un stagiaire de **maîtrise** mention Sciences et Technologies du Végétal (Université de Bourgogne, Arnaud Cousin) aux techniques d'hybridations *in situ* (extraction d'ADN, PCR, marquage de sondes, FISH) ;
- une **technicienne de recherche** (INRA de Dijon, Christine Arnould) à la technique FISH.

Dans le cadre de ma thèse de doctorat, j'ai formé :

- Un étudiant de **BTS** de Biochimie (Lycée Plaine de l'Ain – Ambérieu en Bugey ; Arnaud Ganée) aux techniques d'hybridations moléculaires ;

et encadré :

- Un étudiant de deuxième année de **Deug B** (Bruno Jacrot), avec rédaction d'un rapport de stage (Jacrot, B. 2000. Caractérisation moléculaire de mutants d'un *Fusarium oxysporum* non pathogène altérés dans leur aptitude antagoniste ; Université de Bourgogne, Dijon).

Dans le cadre de mon contrat d'ingénieur, j'ai formé :

- un étudiant de **1^{ère} année de Master** de Biotechnologies et Bio-industries (Université de Rennes – Benoît Aimé) et un étudiant de **Master Professionnel** mention Biologie et Technologies du Végétal (Université d'Angers - Benoît Camus) aux techniques de traitement de la vigne, au suivi de maladies telles que mildiou et oïdium et à quelques techniques de cytologie (microscopie optique et microscopie électronique à balayage) ;
- une étudiante de **Licence** de Biologie (Université de Bourgogne - Annie Buchwalter) à diverses techniques de laboratoire (extraction d'ARN, RT-PCR, PCR, protection contre mildiou)

et encadré :

- une étudiante de **1^{ère} année de Master** de Biochimie (Corine Matar), avec rédaction d'un rapport de stage (Matar C. 2006. Caractérisation de réactions de défense induites chez la vigne, *in planta*, en réponse à un éliciteur oligosaccharidique ; Université de Bourgogne, Dijon) et préparation d'une soutenance orale.