

- qPFD -

Un dispositif original de criblage et d'évaluation de molécules à effet « Stimulateur de Défense Naturelle » des plantes

Contexte

Une stratégie émergente de lutte contre les bioagresseurs consiste à utiliser des produits, non plus biocides, mais inducteurs des défenses de la plante et si possible d'origine naturelle. Dans le cas de stress biotiques, les plantes mettent en œuvre une pluralité de mécanismes endogènes de défense qui peuvent se développer de manière spatio-temporelle à partir du point d'infection ou d'infestation, et concourir à freiner la propagation de la maladie : réaction d'hypersensibilité, résistance acquise locale, résistance acquise systémique. Les mécanismes de défense des plantes inductibles par des bioagresseurs impliquent par exemple des molécules à action antimicrobienne ou insecticide directe ou encore des molécules impliquées dans le renforcement des parois cellulaires, freinant ainsi la colonisation.

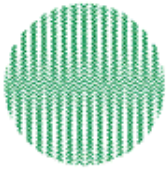
La connaissance approfondie de ces mécanismes de défense a permis le développement et l'utilisation de produits phytosanitaires qui n'agissent plus directement sur la cause du stress, mais qui présentent la propriété d'agir indirectement par la stimulation des mécanismes de défense naturelle. **Ces produits phytosanitaires appelés « Stimulateurs de Défense Naturelle - SDN » ou encore éliciteurs** sont classés selon deux principales familles : **les stimulateurs directs** (qui entraînent, une fois appliqués sur la plante, une activation directe des réactions de défense qu'il y ait ou non présence de pathogènes) et **les potentialisateurs** (qui vont permettre l'activation des défenses à la suite d'un stress ultérieur).

Très peu d'AMM phytopharmaceutiques ont été délivrées à ce jour pour de tels produits. A contrario, une grande diversité de produits accessibles (officiellement ou non) revendiquent plus ou moins explicitement une action de stimulation de défense sans preuves de démonstration, et sont vendus en mélange avec des fertilisants. Enfin, des produits homologués comme intrants phytopharmaceutiques pour des actions autres que phytosanitaires seraient susceptibles d'exercer aussi une action de stimulation des défenses naturelles de plantes. Pour caractériser précisément les produits existants ou à venir sur leur capacité à induire des défenses et donc à entrer dans la catégorie « SDN », il y a une réelle nécessité de développer de nouveaux dispositifs alternatifs ou complémentaires aux tests phénotypiques de protection d'une plante (qui donnent une indication d'efficacité sans préjuger de leur mode d'action). Autrement dit, les différents acteurs du secteur phytosanitaire sont demandeurs d'un dispositif ou d'un outil polyvalent qui permette d'identifier de manière simple et rapide l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes, de cribler des substances pour leurs propriétés de stimulation des défenses des plantes, voire de sélectionner des variétés de plantes sensibles aux SDN.

Description de l'innovation et applications industrielles

L'équipe de Marie-Noëlle Brisset de l'unité de recherche Pathologie Végétale de l'INRA d'Angers a développé **un dispositif original permettant l'étude simultanée des différentes voies métaboliques de défense des plantes aux stress biotiques et/ou abiotiques.**

Il s'agit d'un outil de diagnostic moléculaire appelé « qPFD » (**Puce à Faible Densité Quantitative : RT-PCR quantitative en microplaque / puce à ADN de faible densité**) qui permet d'évaluer un ensemble de 9 groupes représentant **28 gènes cibles dont l'expression, seule ou en combinaison, renseigne sur l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes.** Les résultats de la qPCR sont exploités selon la méthode du $\Delta\Delta CT$ qui fournit les expressions relatives des gènes de défense dans un échantillon donné par rapport à un échantillon témoin, expressions normalisées par la moyenne géométrique de 3 gènes de référence (TuA, Actin, GAPDH) de cet échantillon (profil d'expression génique visualisé sous forme d'une carte de densité, voir Figure 1). Les chercheurs ont spécifiquement choisi les 28 gènes de défense par analogie aux plantes modèles de manière à couvrir les différentes voies de signalisation (ex : acide salicylique, acide jasmonique, éthylène) ou de défense aval (ex : protéines PR ou enzymes du métabolisme secondaire) du pommier (*Malus domestica*), espèce utilisée en l'occurrence pour valider le concept de la qPFD dans le cadre



INRA Transfert

Filiale de l'INRA

d'essais en conditions contrôlées de 10 produits (SDN, éclaircisseurs, régulateurs de croissance) connus pour leur efficacité de protection (pathosystème pommier – *Erwinia amylovora*, agent responsable du feu bactérien). Les tests menés sur des populations de semis de pommier ont démontré **la corrélation existant entre absence de stimulation des gènes de défense sélectionnés et absence d'effet protecteur**. D'autre part, les chercheurs ont montré que **la surexpression d'une combinaison de gènes cibles est le plus souvent associée à la protection contre le pathogène**.

Les applications industrielles de la qPFD concernent :

- **Le criblage et la sélection de nouvelles molécules SDN, ou le criblage de produits existants**
- **L'optimisation de leur utilisation seule ou sous forme de compositions** (dose, délai de réponses, durée d'action, etc.)
- **La sélection de plantes** sensibles à l'action de SDN et présentant une résistance améliorée à un stress (criblage de génotypes pour leur réactivité aux produits SDN)

Cette invention pourra être mise en œuvre par différents acteurs du secteur phytopharmaceutique:

- **Les groupements d'arboriculteurs** pour déterminer si les propriétés annoncées des produits phytosanitaires sont réelles
- **Les commissions professionnelles ou officielles et les laboratoires de contrôle** pour évaluer, sélectionner ou homologuer les produits utiles pour l'arboriculture
- **Les firmes phytopharmaceutiques** pour analyser leurs propres molécules et optimiser leur utilisation
- **Les sélectionneurs** de variétés végétales

Les avantages et intérêts que procurent la qPFD sont nombreux :

- Le gain substantiel de temps et l'économie d'expérimentations au champ, inutiles et coûteuses pour les produits sans effet sur les défenses des plantes
- La qPFD permet d'éviter les traitements redondants (notamment par l'application de composés activant les mêmes mécanismes de défense) et de limiter les interactions négatives (certains produits SDN ont des effets antagonistes au regard des voies moléculaires qu'ils régulent)
- La distinction entre des composés stimulateurs directs et des composés potentialisateurs
- La qPFD permet de s'affranchir de toutes les étapes de mise au point de la PCR quantitative
- Ce dispositif polyvalent ciblant un ensemble de gènes définis permet de déterminer l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes exposées à un ou plusieurs SDN, et/ou exposées à une grande variété de stress biotiques ou abiotiques, et/ou exposées à une combinaison de ces deux expositions
- Des résultats simples, rapides et efficacement interprétables sur l'état de stimulation des défenses naturelles d'une plante
- Prête à l'emploi, la qPFD pourra être utilisée en routine pour analyser les niveaux d'induction des différentes voies de défense des *Rosaceae* (ex : pommier), voire d'autres espèces végétales

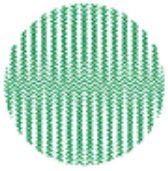
Par ailleurs, il est à noter que l'équipe de Mme Brisset a initié des travaux complémentaires sur la vigne (*Vitis vinifera*), qui est également d'un grand intérêt économique et sujet à de nombreux traitements phytosanitaires, afin de consolider l'approche moléculaire sur d'autres espèces végétales.

Propriété intellectuelle et transfert technologique

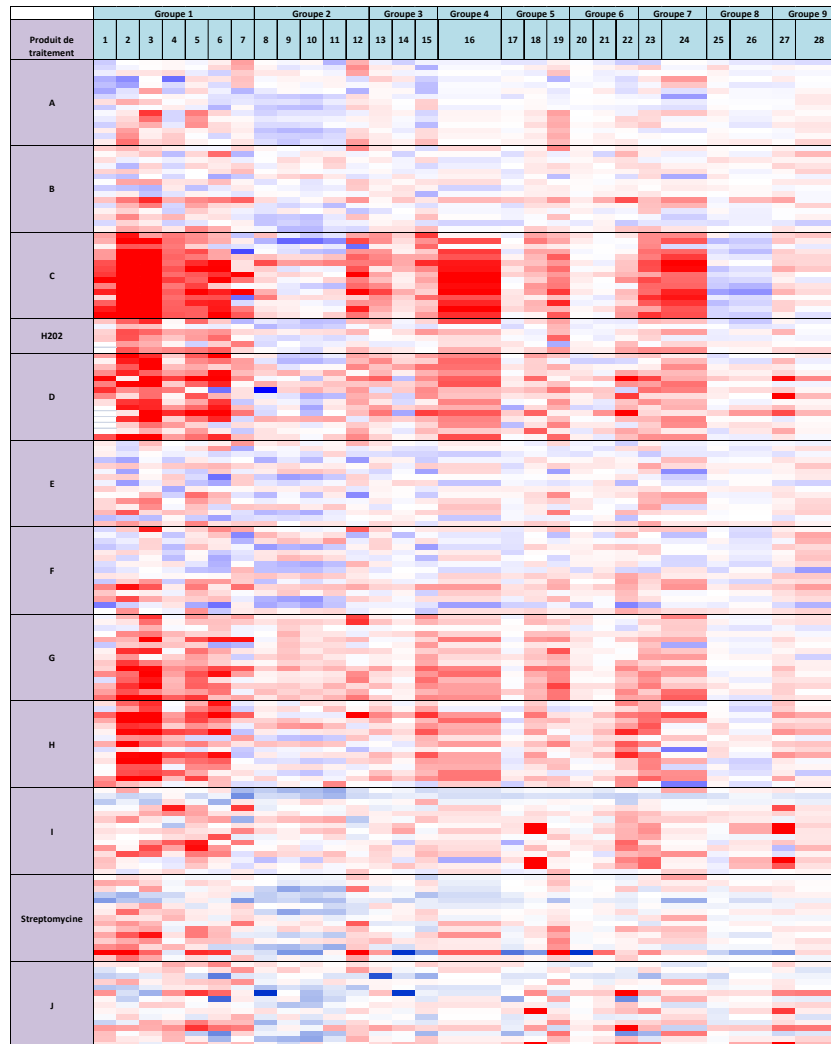
Ces résultats ont été protégés par **la demande de brevet français N°1055042 déposée par l'INRA le 24 juin 2010 et l'extension PCT/FR2011/051470 déposée le 24 juin 2011** sous le titre « Dispositif pour déterminer ou étudier l'état de stimulation des défenses naturelles de plantes ou parties de plantes ».

INRA Transfert est en charge de la valorisation de cette innovation par **la concession de licences** pour des applications commerciales auprès des acteurs du secteur phytopharmaceutique.

De même, **les projets de collaboration de recherche** portant sur les nombreuses applications potentielles (criblages moléculaires, autres pathosystèmes, autres espèces végétales, etc.) de la qPFD seront étudiés avec intérêt par l'INRA.



Figure



Résultats de l'analyse par qPFD de l'état de stimulation des défenses naturelles de semis de pommier traités par différents produits (SDN, éclaircisseurs, régulateurs de croissance). Les colonnes correspondent aux 9 groupes de 28 gènes de stimulation des défenses naturelles de plantes, les lignes correspondent aux essais de traitement par les 10 produits testés comme potentiels SDN. Cette carte de densité indique des niveaux de surexpression de gènes (en rouge), ou de répression de gènes (en bleu) dans des feuilles de semis de pommier. A noter que les produits C, G, H montrent une activation assez similaire d'une même combinaison de gènes, corrélée à une protection contre *Erwinia amylovora*. Aucun des autres produits n'est efficace en protection contre cet agent pathogène, excepté la streptomycine, utilisée ici comme témoin biocide.

Responsable scientifique

Marie-Noëlle BRISSET

Unité de recherche

UMR0077 Pathologie Végétale: Biodiversité, Ecologie, Interactions Bioagresseurs / Plantes

INRA
42 rue Georges Morel
49071 Beaucouzé Cedex
France

Chargée de valorisation

Claire NODET

INRA Transfert
28, rue du Docteur Finlay
75015 Paris
France

Phone: +33 (0) 1 42 75 93 44

Fax: +33 (0) 1 45 77 63 90

Email : claire.nodet@paris.inra.fr