

## Renouvellement

### Appel à projets pour 2026

#### Dossier de proposition de Projets Collaboratifs et de Manifestations Scientifiques

**A transmettre avant le 10 Juin 2024, en PDF, à l'adresse [sfr-tersys@univ-avignon.fr](mailto:sfr-tersys@univ-avignon.fr) avec l'intitulé suivant : ACRONYME\_Nomporteurs\_Unités\_AAP2026TERSYS.pdf**

Responsable(s) du projet	Christelle Lacroix (Unité INRAE PV équipe MISTRAL) Sylvain Piry (Unités INRAE PV équipe Virologie, et INRAE CBGP)
Liste des laboratoires de la SFR impliqués et des plateformes	INRAE – Pathologie Végétale PV
Laboratoire gestionnaire du financement <sup>1</sup>	INRAE – UR407 Pathologie végétale
Coordonnées du/de la gestionnaire de laboratoire	Nom : Pascale Favier ; Céline Gilly ; Marie Le-Tirrand ✉ : <a href="mailto:pascale.favier@inrae.fr">pascale.favier@inrae.fr</a> ; <a href="mailto:celine.gilly@inrae.fr">celine.gilly@inrae.fr</a> ; <a href="mailto:marie.le-tirrand@inrae.fr">marie.le-tirrand@inrae.fr</a> ☎ : 04 32 72 28 40, 04 32 72 28 43, 04 32 28 29 74
Titre du projet	CLIMAT - Effet de paramètres climatiques sur la dynamique intra-plante de populations de bactéries <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> biovar 3, et sur la sévérité de la maladie du chancre bactérien du kiwi

#### 1. Contexte scientifique du projet (10-15 lignes max)

Les facteurs climatiques pourraient impacter la qualité et la quantité des productions agricoles *via* des effets indirects sur la dynamique intra-plante de pathogènes de plantes. La maladie du chancre bactérien, causée par des souches *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) appartenant au biovar 3, est responsable de pertes agronomiques et économiques sévères pour la culture du kiwi au niveau mondial. La compréhension et la modélisation de la dynamique épidémique de cette maladie, ainsi que sa gestion sur le terrain, reposent essentiellement sur l'observation de symptômes et de dégâts induits. Or, les fluctuations intra- et interannuelles de symptômes en vergers ne permettent pas de bien prédire l'état infectieux des arbres en raison de phases asymptomatiques, et restent difficilement prédictibles. Les fluctuations de l'incidence et de la sévérité de cette maladie pourraient être mieux prédictes et modélisées sur la base i) d'un indicateur alternatif aux symptômes, i.e. la taille des populations de bactéries au sein d'arbres de kiwis et ii) de données empiriques sur l'influence de facteurs abiotiques sur celui-ci. Ce projet vise à étudier l'impact de paramètres abiotiques (température, humidité relative) en conditions contrôlées sur la dynamique de populations bactériennes Psa dans des plants de kiwi (*Actinidia chinensis*), sur la base de l'optimisation d'une méthode de qPCR à haut-débit.

<sup>1</sup> Le financement complet de chaque projet TERSYS sera de préférence géré par un seul laboratoire afin de faciliter et d'accélérer le démarrage des projets en 2026.

## Renouvellement

### Appel à projets pour 2026

#### Dossier de proposition de Projets Collaboratifs et de Manifestations Scientifiques

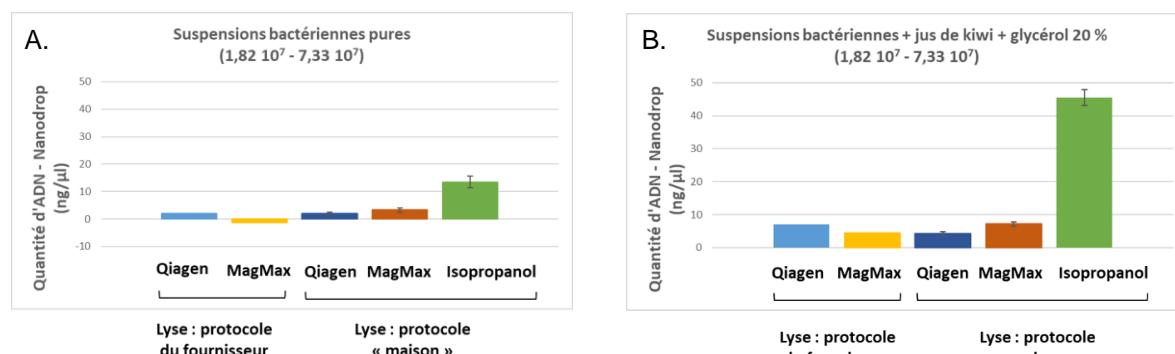
## 2. Résultats Préliminaires obtenus

### Tâche I.a : augmenter le débit d'analyse d'échantillons

Les cinq premiers mois ont permis d'adresser le premier objectif (I.a) du projet CLIMAT. Celui-ci correspond à augmenter le débit d'analyse d'une méthode de qPCR existante pour déterminer la taille de populations de bactéries *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) biovar 3. Cet objectif est en cours de réalisation en collaboration avec une stagiaire (Ilef Guirat) dans le cadre de la fin son cursus (équivalent M2) d'ingénieur en biologie (INSA, Tunisie), sous l'encadrement de Cécile Monteil (TR), de Christelle Lacroix (CR) et de Sylvain Piry (IR).

#### Extraction d'ADN

Pour atteindre cet objectif, la première étape a consisté à optimiser l'étape d'extraction d'ADN avant qPCR pour un obtenir un protocole efficace, relativement peu couteux, et à haut-débit. Des expérimentations menées précédemment au démarrage du projet CLIMAT ont permis de montrer que l'efficacité de l'extraction d'ADN, testée sur la base d'échantillons de synthèse (i.e. suspensions pures et en mélange avec du jus de kiwi glycérolé), est variable en fonction des kits et des protocoles d'extraction (Figure 1). En effet, deux kits d'extraction d'ADN fréquemment cités dans la littérature, Qiagen DNeasy® Plant Mini kit et MagMAX™ Plant DNA Kit, ont permis d'obtenir des rendements d'ADN très faibles (< 10 ng/μl) voire nuls après extraction (Figure 1A. et 1B.), sur la base du protocole du fournisseur avant et après tentatives d'optimisation sur la base d'un tampon de lyse « maison » de type TNESP. Un protocole alternatif, dont l'étape de précipitation d'ADN est réalisée avec de l'isopropanol, a permis d'obtenir des rendements d'ADN plus élevés.



**Figure 1. Quantité d'ADN (ng/μl) estimée par Nanodrop** après extraction réalisée à partir d'échantillons de synthèse correspondant à des suspensions bactériennes pures (A) et en mélange avec du jus de kiwi obtenu après broyage de feuilles avec un tampon phosphate et du glycérine 20% (B). Deux kits d'extraction d'ADN fréquemment cités dans la littérature, Qiagen DNeasy® Plant Mini kit et MagMAX™ Plant DNA Kit, ont été testés selon le protocole du fournisseur sur la base d'un réplica par type d'échantillon, i.e. suspension bactérienne pure (A) et en mélange (B). Ces deux kits, ainsi qu'un protocole alternatif à base d'isopropanol, ont été testés sur la base d'un protocole modifié notamment au niveau du tampon de lyse, et de 6 réplicas par type d'échantillons et d'extraction.

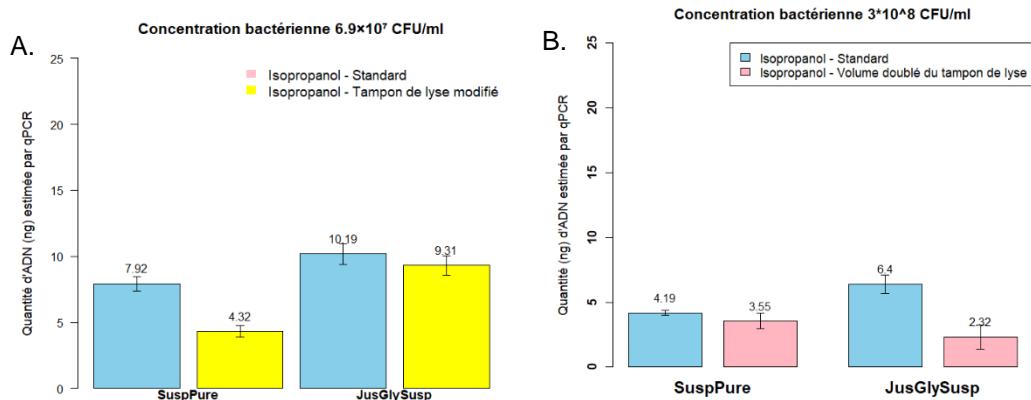
Dans le cadre du projet CLIMAT, deux protocoles d'extraction d'ADN ont été sélectionnés pour optimisation. Le protocole d'extraction à base d'isopropanol a été retenu en raison des résultats préliminaires encourageants obtenus précédemment (Figure 1) et du faible coût par échantillon (2.05 euros). Cependant, le caractère chronophage et faible débit de ce protocole (10 heures pour 24 échantillons en tubes individuels) nous a conduit à tester une autre méthode d'extraction, à l'aide d'un kit à base de billes magnétiques (Macherey Nagel NucleoMag) et d'un robot d'extraction (Ideal 96). Cette méthode présente les avantages d'augmenter le débit d'extraction (6 heures pour 96 échantillons en plaque) et de réduire le risque d'erreurs humaines de pipetage, bien qu'impliquant un coût par échantillon plus élevé (4.28 euros).

## Renouvellement

### Appel à projets pour 2026

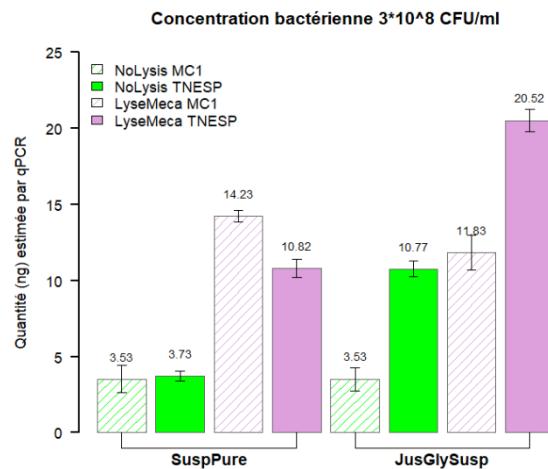
#### Dossier de proposition de Projets Collaboratifs et de Manifestations Scientifiques

Plusieurs modalités pour optimiser ces deux protocoles ont été testées dans le cadre du projet CLIMAT. Les deux modifications (composition et volume du tampon de lyse) du protocole d'extraction à base d'isopropanol testées (Figure 2) ont conduit à une quantité d'ADN extraite similaire ou plus faible au rendement obtenu avec le protocole standard, à la fois pour les suspensions bactériennes pures et en mélange avec du jus de kiwi glycérolé.



**Figure 2. Quantité d'ADN (ng/µl) estimée par qPCR** après extraction réalisée à l'aide du protocole à base d'isopropanol. Deux modifications du protocole standard (tel que réalisé lors de précédentes expérimentations) ont été testées, i.e. ajustement de la composition du tampon de lyse (A), et doublement du volume de tampon de lyse (B). Ces essais ont été réalisées avec 3 répliques pour chaque type d'échantillons ; i.e. les suspensions bactériennes pures (SuspPure), et en mélange avec du jus de kiwi glycérolé (JusGlySusp) ; et par modalité.

Pour une concentration bactérienne (~ 10<sup>8</sup> CFU/ml) similaire à celle testée avec le protocole à base d'isopropanol, l'extraction en plaque 96 puits à l'aide du kit NucleoMag et du robot Ideal96 permet d'obtenir des rendements en ADN équivalents ou supérieurs, notamment lorsqu'une étape de lyse mécanique avec des billes de verre est intégrée (Figure 3). L'effet du tampon de lyse (MC1 et TNESP) semble dépendant du type d'échantillons testés (suspensions pures et en mélange).



**Figure 3. Quantité d'ADN (ng/µl) estimée par qPCR** après extraction réalisée à l'aide du kit NucleoMag et du robot d'extraction Ideal96. Quatre modalités ont été testées ; i.e. tampon de lyse MC1 fourni avec le kit et TNESP, et ce avec ou sans étape de lyse mécanique avec des billes de verre. Ces essais ont été réalisées avec 3 répliques pour chaque type d'échantillons ; i.e. les suspensions bactériennes pures (SuspPure), et en mélange avec du jus de kiwi glycérolé (JusGlySusp) ; et par modalité.

## Renouvellement

### Appel à projets pour 2026

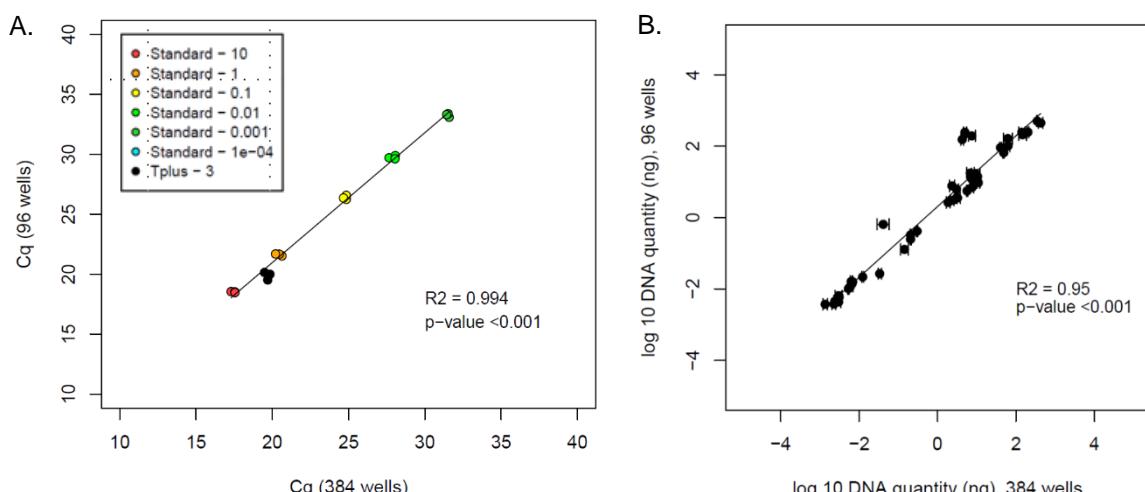
#### Dossier de proposition de Projets Collaboratifs et de Manifestations Scientifiques

Les plus récentes expérimentations réalisées à l'aide du kit NucleoMag et du robot Ideal96 ont montré une plus grande variabilité de la quantité d'ADN estimée en qPCR lorsque l'extraction est réalisée avec le tampon de lyse TNESP vs. MC1, et notamment pour des concentrations bactériennes faibles ( $\sim 10^5$  CFU/ml).

L'extraction en plaque à l'aide du kit NucleoMag, du tampon MC1 et du robot Ideal96 a été sélectionnée pour la suite des expérimentations, en raison du plus haut-débit (96 échantillons par plaque), du coût raisonnable par échantillon (4.28 euros), et de la meilleure efficacité d'extraction d'ADN pour deux concentrations bactériennes ( $10^8$  et  $10^5$  CFU/ml) qui permet d'espérer une bonne sensibilité de cette méthode.

#### Analyse qPCR

La deuxième étape pour atteindre le premier objectif du projet CLIMAT a consisté à augmenter le débit d'analyse d'extraits d'ADN en qPCR. L'analyse en triplicatas d'une même séries d'extraits d'ADN (gammes standards constituées d'une dilution seriée de  $10$  à  $10^{-4}$  ng d'une solution d'ADN obtenue avec un kit d'extraction d'ADN génomique, témoin positif ajusté à 3 ng d'ADN, extraits d'ADN de 47 échantillons à tester) montre une bonne corrélation pour les résultats obtenus en plaque 96 et 384 puits (Figure 4).



**Figure 4. Corrélation entre le Cq obtenu en plaque qPCR 96 et 384 puits pour chacun des triplicatas des points de standards (dilutions sérielles de  $10$  à  $10^{-4}$  ng d'ADN d'une souche bactérienne *Psa* Biovar 3) et du témoin positif (A), et entre le  $\log_{10}$  de la quantité d'ADN estimée en qPCR pour 47 échantillons sur la base de la courbe standard obtenue en plaque 96 et 384 puits.**

L'ensemble de ces résultats montrent que l'estimation de la taille des populations de bactéries *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) biovar 3 est possible sur la base d'une méthode à haut-débit d'extraction d'ADN en plaques 96 puits (kit NucleoMag et robot Ideal96) et d'analyse en qPCR en plaque 384 puits. L'analyse de la reproductibilité de l'ensemble de la méthode (extraction et qPCR) et de sa sensibilité est en cours. Les trois protocoles associés (isopropanol à bas débit, NucleoMag/robot Ideal 96 à plus haut- débit, analyse en qPCR) sont en cours de rédaction au format standardisé Management Qualité Recherche (MQR).

## Renouvellement

### Appel à projets pour 2026

#### Dossier de proposition de Projets Collaboratifs et de Manifestations Scientifiques

##### Traitement bio-informatique des données brutes qPCR

Un script R a été développé par C. Lacroix pour formater, nettoyer et traiter de façon traçable et reproductible les données brutes sorties de l'instrument qPCR. Ce script est utilisé actuellement en routine par C. Monteil et I. Guirat pour produire les analyses et les graphiques d'illustration de données, sur la base de modifications spécifiques à chacune des expérimentations citées ci-dessus. En collaboration entre S. Piry, C. Lacroix et C. Monteil ; ce script sera très prochainement optimisé pour i) standardiser le processus de traitement et d'analyse de données issus de centaines d'échantillons de kiwis (cf. Tâche 2), ii) vérifier et compléter les annotations du script, iii) produire une documentation d'analyse via l'usage de R markdown.

##### **Tâche I.b. : analyser l'effet de facteurs abiotiques (température, humidité relative) sur la taille de population de bactéries Psa Biovar 3 au niveau de pétioles (points d'inoculation) de kiwis**

La méthode d'extraction sélectionnée dans le cadre de la réalisation de la tâche I.a. (kit NucleoMag, tampon MC1 et du robot Ideal96) a été testée pour trois séries de 10 échantillons. Ceux-ci ont été prélevés lors d'expérimentations précédentes et conservés depuis au congélateur -80°C. Le but de ces expérimentations était de tester l'effet de la température et de l'humidité relative sur la sévérité de la maladie du chancre bactérien du kiwi induite par une souche Psa représentative du biovar 3, et sur la taille et la distribution intra-plante des populations bactériennes 14 et 28 jours après inoculation. Les trois séries d'échantillons testés correspondent à dix fragments de tissus (pétioles, tige, limbe foliaire) de chacune de trois plantes inoculées avec une souche Psa biovar 3. La quantité d'ADN extraite par échantillon estimée au Nanodrop est en moyenne de 63.4, 26.5 et 17.7 ng/µl pour chacune des trois plantes. Ces résultats encourageants sont à confirmer par l'analyse prochaine des extraits d'ADN correspondants en qPCR.

La suite de la première année du projet CLIMAT pour la tâche I.b. va donc concerter l'analyse de la taille de population de bactéries Psa Biovar 3 estimée par qPCR au sein d'échantillons (N=320) prélevés au niveau des points d'inoculations (i.e. 2 pétioles par plante) au sein de 160 plantes à 15 ou 28 dpi lors des expérimentations précédentes. Les échantillons ont été stockés au congélateur -80°C et sont prêts à être analysés. Les analyses statistiques de données seront réalisées (C. Lacroix, I. Guirat, C. Monteil) sur la base de modèles linéaires et de modèles linéaires généralisées en fonction de la distribution de chaque variable de réponse. Ces analyses concerteront i) l'effet de la température et l'humidité relative sur la taille de populations bactériennes de type Psa biovar 3 aux points d'inoculation (pétioles) des plantes, et ii) la corrélation entre cette taille de population et la sévérité de la maladie du chancre bactérien mesurée sur la base de plusieurs variables phénotypiques (symptômes et croissance des plantes).

### 3. Justification scientifique de la prolongation

La prolongation du projet CLIMAT a comme objectif la réalisation de deux objectifs. Le premier objectif concerne l'effet de facteurs abiotiques (température et humidité relative) sur la distance et la vitesse de migration (tâche II. en année 2) à partir des points d'inoculations (tâche I.b., année 1) de populations de bactéries Psa biovar 3 au sein des plantes à 14 et 28 dpi. Les échantillons (morceaux de tiges, limbes foliaires) ont également été stockés au congélateur -80°C à l'issue des expérimentations précédentes et sont également prêts à être analysés.

L'ensemble des données produites dans le cadre des deux années du projet CLIMAT permettront ainsi de déterminer l'effet de paramètres abiotiques (température et humidité relative) non seulement sur l'installation et la multiplication des populations bactériennes au niveau local (pétioles) après inoculation (année 1) mais aussi sur leur vitesse de migration systémique à partir de ces points d'inoculation (année 2).

## Renouvellement

### Appel à projets pour 2026

#### Dossier de proposition de Projets Collaboratifs et de Manifestations Scientifiques

L'analyse de la taille de populations de souches Psa biovar 3 pourra permettre d'améliorer l'épidémirosveillance sur la base d'une meilleure analyse de l'incidence de la maladie. De plus, l'analyse des effets de facteurs abiotiques sur la charge bactérienne et la vitesse de migration intra-plante pourrait permettre de mieux prédire la sévérité du chancre bactérien, ainsi que d'établir des hypothèses concernant les scénarios probables de dispersion inter-plantes en fonction de conditions climatiques contrastées et changeantes.

Le second objectif de la deuxième année du projet CLIMAT consiste à la conception et le test d'amorces et de sondes qPCR spécifiques à des souches Psa d'autres biovars dont l'incidence est plus faible au niveau mondial mais potentiellement associé à des risques de nouveaux épisodes d'émergence de la maladie du chancre bactérien. Il s'agira de concevoir à l'aide du logiciel Geneious (installation existante) un couple d'amorces et une sonde TaqMan pour chaque biovar (e.g. biovar 1 et 2). La spécificité, l'efficacité d'amplification, et la sensibilité sera testée, et si besoin améliorée, pour chaque ensemble (amorces+sonde). Chaque sonde sera dotée d'un fluorochrome de longueur d'onde différente de façon à offrir la possibilité de quantifier en multiplex la taille de populations de souches Psa de différents biovars au sein d'un même échantillon. Ces outils ouvriront la voie pour l'examen futur de questions liées aux i) risques de (ré)émergence de souches de ces biovars dans le contexte du changement climatique, ii) effets de co-infections entre souches Psa de plusieurs biovars, et aux effets potentiellement interactifs entre ces co-infections et l'environnement abiotique, sur la santé des plantes et la qualité de productions agricoles. La méthodologie de qPCR mise au point pour les souches Psa de plusieurs biovars sera publiée dans un journal international à comité de lecture, et en science ouverte.

#### 4. Budget

##### - Justification des dépenses réalisées

##### - Justification des besoins supplémentaires

Le budget dépensé durant les 5 premiers du projet CLIMAT est de 2854 euros sur les 5400 euros alloués (frais de gestion déduits). Ce budget correspond au frais de consommables (e.g. kits et réactifs qPCR et d'extraction ; et microtubes, pointes, et plaques) liés à l'optimisation d'une méthode d'analyse à haut-débit (extraction + qPCR) de la taille de populations bactériennes au sein d'échantillons de kiwi (tâche I.a.), et pour l'initiation du traitement d'échantillons issus d'expérimentations précédentes visant à tester l'effet de la température et de l'humidité relative (tâche I.b.). Le reste du budget alloué en année 1 sera dédié à l'analyse du reste des 320 échantillons prélevés au niveau des points d'inoculations (i.e. 2 pétioles par plante) au sein de 160 plantes à 15 ou 28 dpi lors des expérimentations précédentes. La gratification (3895 euros) pour les 6 mois de stage de fin d'études (équivalent Master 2) d'Ileef Guirat a été assurée par le soutien du projet ANR-PPR Beyond « Building epidemiological surveillance and prophylaxis with observations near and distant » (Cindy Morris, Samuel Soubeyrand) en particulier dans le cadre de la tâche 6.1 (« Detection methods that account for the contours of diversity of pathogens »).

Le budget demandé pour l'année 2026 est de 7000 euros (unité INRAE PV). Ce budget couvrira les frais de fonctionnement (e.g. kits et réactifs qPCR et d'extraction ; et microtubes, pointes, et plaques) pour l'analyse de la taille de population de bactéries Psa biovar 3 au sein d'échantillons (N=1280 au total, i.e. 8 par plante) de plantes (tiges, limbes foliaire) prélevés à différentes distances des points d'inoculation à 14 et 28 dpi lors des mêmes expérimentations précédentes (6000 euros). Ces données permettront de tester l'effet de facteurs abiotiques (température et humidité relative) sur la distance et la vitesse de migration intra-plante à partir des points d'inoculations de populations de bactéries Psa biovar 3.

## Renouvellement

### Appel à projets pour 2026

#### Dossier de proposition de Projets Collaboratifs et de Manifestations Scientifiques

Le budget pour l'année 2026 permettra également de transposer la méthode à haut-débit mise au point (extraction et qPCR) pour des souches Psa du biovar 3 à d'autres biovars (1000 euro ; objectif initialement prévu en année 1 mais non réalisable au regard du budget alloué). La production de ces outils soutiendra la réalisation de futurs projets de recherche (ANR) concernant les risques d'émergence et d'impacts sur la qualité des productions agricoles liés à différents types de souches Psa dans un contexte de changements climatique.