

**Identification de biomarqueurs métaboliques de l'infection par le *Plum Pox Virus* (virus de la Sharka) chez des variétés de *Prunus* sp. d'Occitanie. Proposition d'un outil de détection précoce.
ID-SharK**

Résumé

La Sharka est une maladie virale des pêchers et pruniers. C'est une problématique économique majeure en Occitanie et aucun moyen de lutte n'existe contre ce virus. Seules des méthodes prophylactiques peuvent être employées, comme l'utilisation de plants sains ou l'arrachage des arbres contaminés (110 Ha arrachés en 2018 dans les PO). Une méthode par amplification génétique permet de détecter le virus dans les feuilles présentant des signes visuels de la maladie. Cette technique ne permet pas de discriminer les arbres sains des arbres contaminés asymptomatiques et n'est pas en mesure de détecter le PPV dans les plants jeunes.

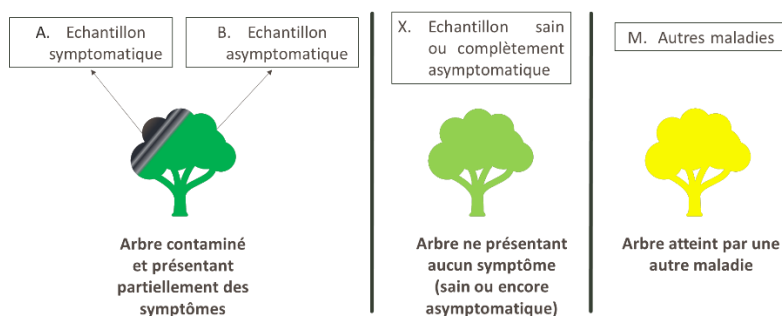
Nous proposons de développer une méthode de détection précoce du virus. Nos travaux ont d'ores et déjà permis de caractériser des biomarqueurs de la Sharka pour certaines variétés de pêchers ; le projet proposé permettra l'identification des biomarqueurs spécifiques aux variétés d'intérêt régional et d'adapter l'outil à la détection du virus aux jeunes plants.

Présentation scientifique du projet de recherche

Contexte :

En 2018, 110 Ha de pêchers contaminés par la sharka ont été arrachés dans les Pyrénées-Orientales, représentant une perte de 3 300 tonnes de pêches (Source : FDGDON 66). Afin de pouvoir enrayer cette épidémie, ID-SharK vise à proposer un outil adapté de détection précoce du virus avant même que les arbres ne développent leur caractère infectieux. Ce projet s'appuie sur une thèse actuellement en cours au CRIOBE. Nos premiers résultats ont mis en évidence l'expression de biomarqueurs métaboliques liés à l'infection du virus dans différentes espèces types. Ces biomarqueurs sont d'origine végétale, exprimés de façon systémique, précoces et communs aux arbres contaminés symptomatiques et asymptomatiques (Fig. 1).

Stratégie d'échantillonnage



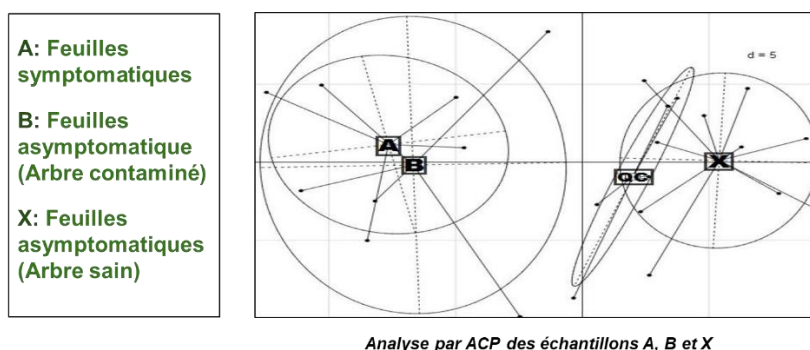


Fig. 1 : Echantillonnage de feuilles de pêchers et graphique de l'ACP des profils métaboliques réalisés sur les extraits de feuilles adultes par UPLC/HRMS.

Les recherches en cours sont réalisées sur des feuilles d'arbres issues des vergers des PO de variétés sélectionnées provenant des grandes classes de la production (pêches jaunes, pêches blanches, pêches plates, abricots et prunes). Les études préliminaires montrent un profil de réponse métabolique différent en fonction des classes de production étudiées, suggérant que les biomarqueurs de l'infection ne seraient pas communs à ces différentes classes (Fig. 2). Par ailleurs les composés et /ou leur concentration relative permettant de discriminer les arbres sains des arbres infectés seraient spécifiques des classes considérées.

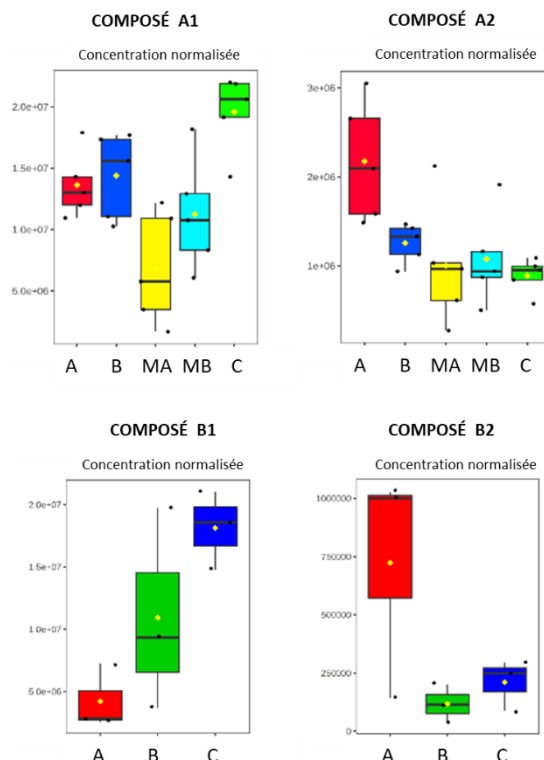


Fig. 2 : Concentration normalisée de composés chez les arbres *pêches blanches* (A1, A2) et arbres *pêches jaunes* (B1, B2). (A) feuilles infectées symptomatiques, (B) feuilles infectées asymptomatiques, (C) contrôle sain, (MA) feuilles symptomatiques d'arbres infectés par un autre pathogène (MB) feuilles

asymptomatiques d'arbres infectés par un autre pathogènes

L'objectif d'ID-SharK est de :

- caractériser les biomarqueurs de l'infection virale pour les variétés d'intérêt régional qui seront prédéfinies en collaboration avec la filière de production locale,
- valider la méthode de détection développée au CRIOBE : échantillonnage, extraction, analyse HRMS et traitement statistique,
- proposer un protocole d'échantillonnage adapté à la prospection au champ, en collaboration avec les producteurs et l'organisme accrédité pour les prélèvements et transport de matériel contaminé (FDGDON 66),
- étudier la faisabilité de détection par métabolomique sur jeunes plants, afin de proposer *in fine* un outil adapté à la détection du virus sur racine avant plantation.

La méthode proposée :

- en collaboration étroite avec la profession et la FDGDON 66 nous définirons un plan expérimental représentatif des variétés d'intérêts du département,
- l'échantillonnage sera effectué par les services de la FDGDON,
- les feuilles et les parties racinaires prélevées seront analysées selon la méthode développée (UPLC/HRMS) par le CRIOBE,
- l'ensemble de données issues des profils métaboliques sera soumis à des analyses statistiques (ACP, OPLS-DA...) afin de cibler les composés responsables de la discrimination entre des profils issus de feuilles d'arbres considérés comme sains et de feuilles d'arbres contaminés asymptomatiques,
- dans un objectif de caractérisation chimique, les composés ciblés ci-dessus seront soumis à un processus de déréplication, la construction de réseaux de similarité spectrale sera effectuée.
- une fois les biomarqueurs caractérisés, l'optimisation du protocole analytique pourra débiter : i) réduction de la taille de l'échantillon, ii) optimisation du protocole d'extraction, iii) diminution du temps d'analyse en chromatographie, iv) ciblage des composés en HRMS (single ion monitoring), v) formalisation du protocole de traitement statistique de l'ensemble des données brutes issue de l'analyse UPLC/HRMS,
- en prérequis à l'adaptation de l'outil métabolomique au système racinaire, il sera nécessaire de transposer et de valider la méthodologie moléculaire normée sur bourgeon (ref. : ANSES/LSV/MA 043 - V2) au système racinaire afin définir l'état sanitaire du matériel végétal,
- une pré-étude métabolique sur les systèmes racinaires sera effectuée sur un nombre limité de variétés afin d'évaluer la sensibilité de l'approche.

Moyens Techniques :

Le CRIOBE héberge et gère le Plateau Métabolites Secondaires, Xénobiotiques et Métabolomique Environnementale de la plateforme Bio2Mar. Le plateau MSXM est identifié par l'infrastructure nationale « Metabohub » (<http://www.metabohub.fr>) comme un site d'expertise en métabolomique environnementale.

Le CRIOBE est équipé d'un laboratoire de quarantaine afin de pouvoir réceptionner, stocker et préparer les échantillons biologiques avant analyses métabolomique. Il dispose par ailleurs d'une plateforme de biologie moléculaire adaptée à la préparation, l'extraction et à la détection des ARN viraux.

Comité de Pilotage : Directeurs de thèse, T. Candresse (INRA Bordeaux), JM Audergon (INRA Avignon), D Rolin (Univ Bdx1).

Liens du sujet de thèse avec les activités de l'unité de recherche d'accueil (saisie libre de 1000 caractères max.) :

Le Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (USR 3278) est l'un des plus éminents laboratoires français pour l'étude des écosystèmes coralliens. Depuis 2010, le CRIOBE pilote le Laboratoire d'Excellence CORAIL (LABEX). Ses activités s'exercent à travers de multiples disciplines - l'écologie, la génétique, la chimie. Ce sujet s'intègre parfaitement dans un des axes principaux de recherche qu'est l'écologie chimique ainsi que dans le développement des compétences en métabolomique amorcé depuis 2010. L'équipe développe depuis plus de 10 ans des approches en métabolomique et organisera le congrès du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique à Perpignan en Juin 2020. Les encadrants se forment régulièrement à l'utilisation des logiciels (R, Galaxie, W4M...) nécessaires au traitement des grands volumes de données générées en métabolomique.