



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche

INRAE

L'INSTITUT
agro Dijon



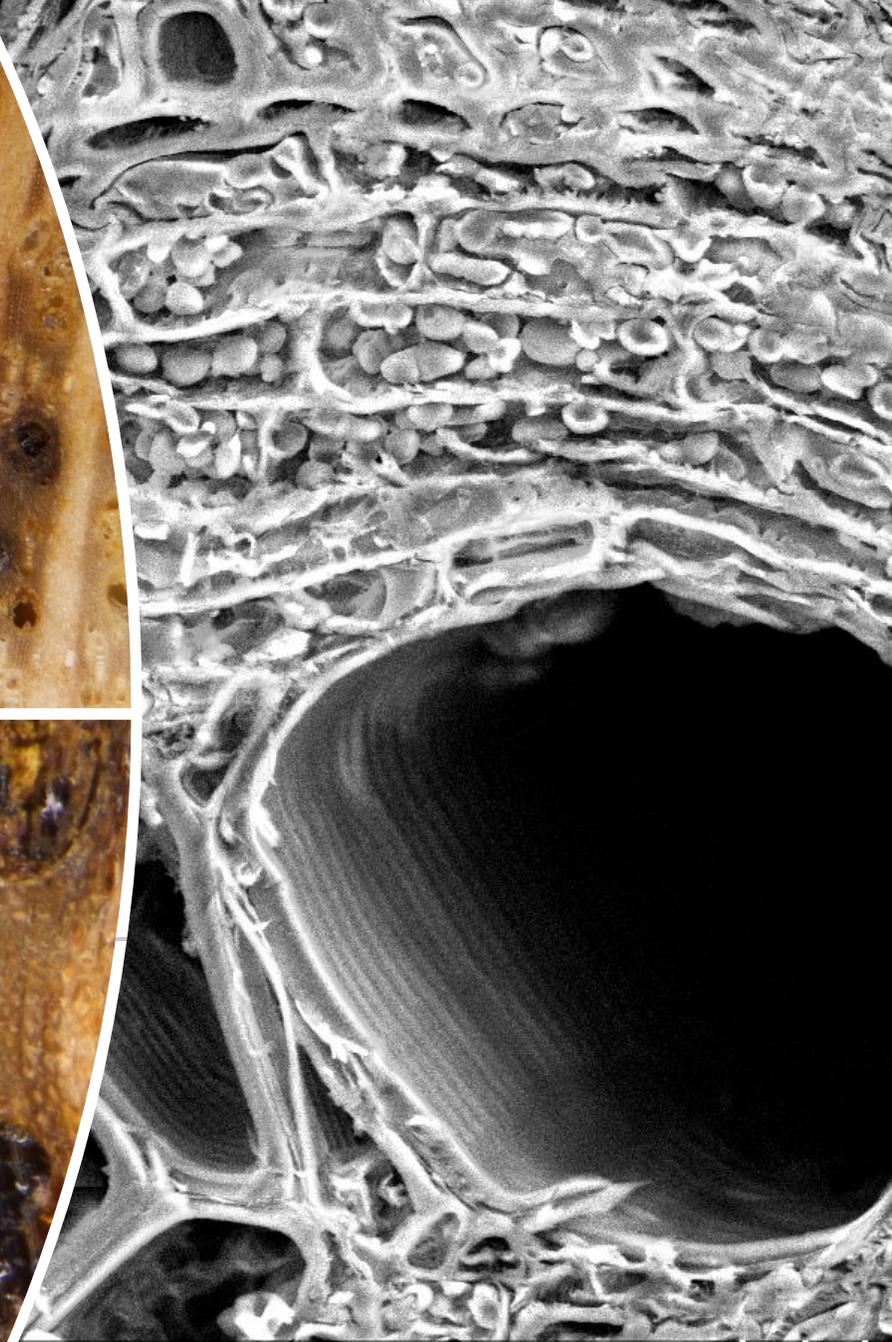
UBFC
UNIVERSITÉ
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Apport de la cytologie pour décrire et comprendre les dépérissements de la vigne



Sophie Trouvelot, Université de Bourgogne
(Institut Universitaire de la Vigne et du Vin)

sophie.trouvelot@u-bourgogne.fr



Contexte de l'étude



- 2022 : - 42,4 millions hectolitres de vin ;
 - 2^{ème} producteur au monde après Italie ;
 - 12,7 milliards d'euros à l'export (2nde place après aéronautique)



Dépérissement



LE DÉPÉRISSEMENT EST RESPONSABLE D'UNE PERTE DE RENDEMENT ANNUELLE DE

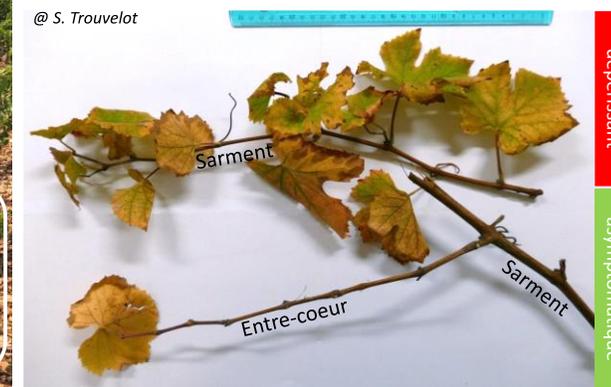
4,6 hL/ha

Source Mission FAM-CNIV-BIPE 2015



900 millions à 1 milliard d'euros

PLAN NATIONAL DÉPÉRISSEMENT DU VIGNOBLE



L'approche histologique pour :



1. Phénotyper les **effets *in planta*** de différents dépérissements ;
2. **Localiser / Discriminer *in situ*** certains agents infectieux responsables de dépérissement ;
3. Appréhender l'effet ou la répartition de **méthodes de lutte** potentielle ou proscrite.

Méthodologies & appareils utilisés



Loupe optique à **fond clair**



Loupe optique à **épifluorescence**



Microscopie optique à **fond clair**



Microscopie optique à **épifluorescence**



Microscopie électronique à **balayage**

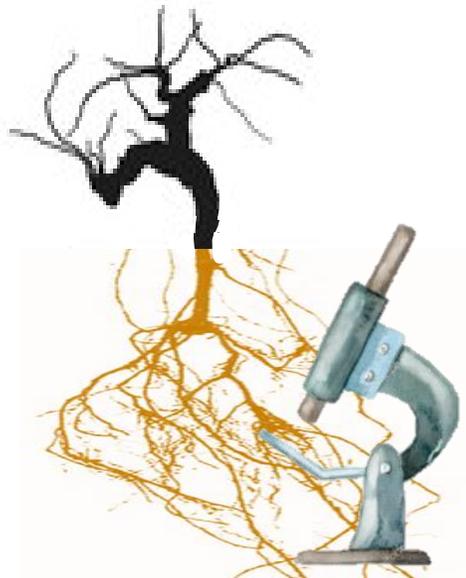


Hybridation *in situ* - microscopie optique à **fond clair** ou **confocale**

Phénotypage *in planta* des effets de

dépérissements :

porte-greffe 161-49 C



Approches et méthodes



Loupe optique à **fond clair**

- **Coupe transversale** au sécateur (0,5 cm de hauteur) de l'échantillon frais ;
- **Rafraichissement** en surface (lame de rasoir) et observation de la surface ;
- **Coupe transversale** manuelle la plus fine possible ;
- **Observation** sous loupe binoculaire / microscope avec éclairage par le dessous.



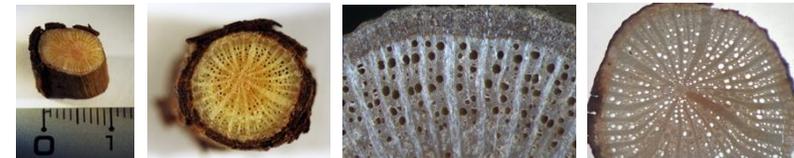
Microscopie optique **fond clair**

- **Fixation** (1 nuit à 4°C) en 2,5% glutaraldéhyde en tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,2) contenant 1% de saccharose
- **Rinçages** (3 x 1h) en tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,2 ; 4 °C)
- **Post-fixation** (1h) au tétr oxyde d'osmium 1 % (v/v, dans du tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,2 ; 4°C)
- **Déshydratation** dans des bains progressifs d'éthanol [(30 % ; 50% ; 70% et 100 %, v/v), 30 min] puis puis d'oxyde de propylène (2 x 30 min)
- Imprégnation en **résine Epon** 812 (Merck) et oxyde de propylène [(2-1 ; 1-1 ; 1-2 (v/v)], puis résine pure (1 nuit)
- **Polymérisation** à 60°C (48 h)
- **Coupes semi-fines de** 0,5µm d'épaisseur (diamant histo 45° Diatome ; angle de coupe de 6°)
- Coloration **bleu de toluidine** (0,2%, pH 11)
- Observations au **microscope photonique** (Leica Leitz DMRB, Wetzlar, Allemagne)



Microscopie électronique à **balayage**

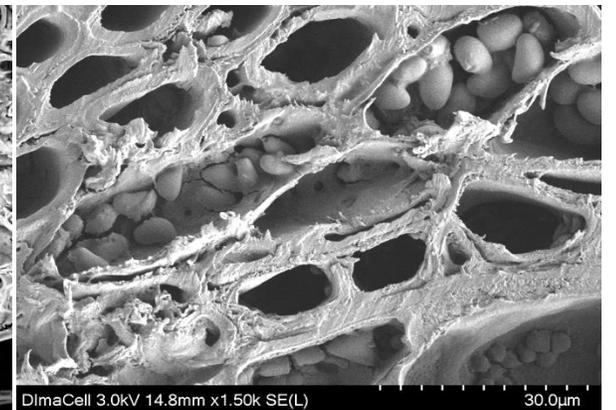
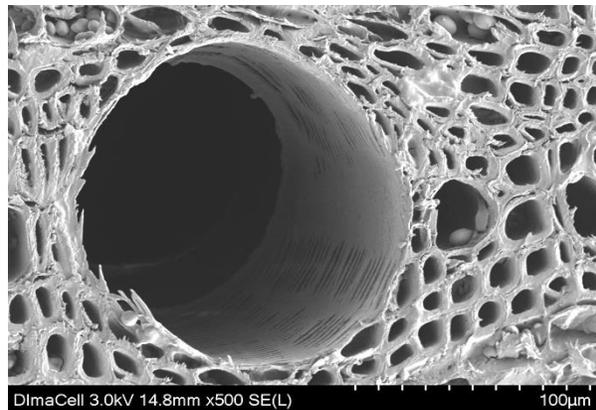
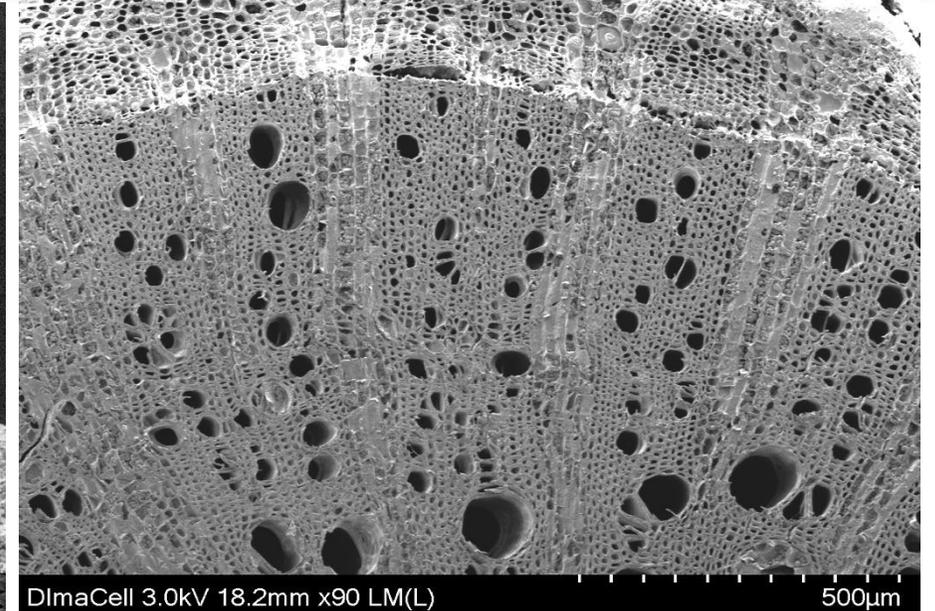
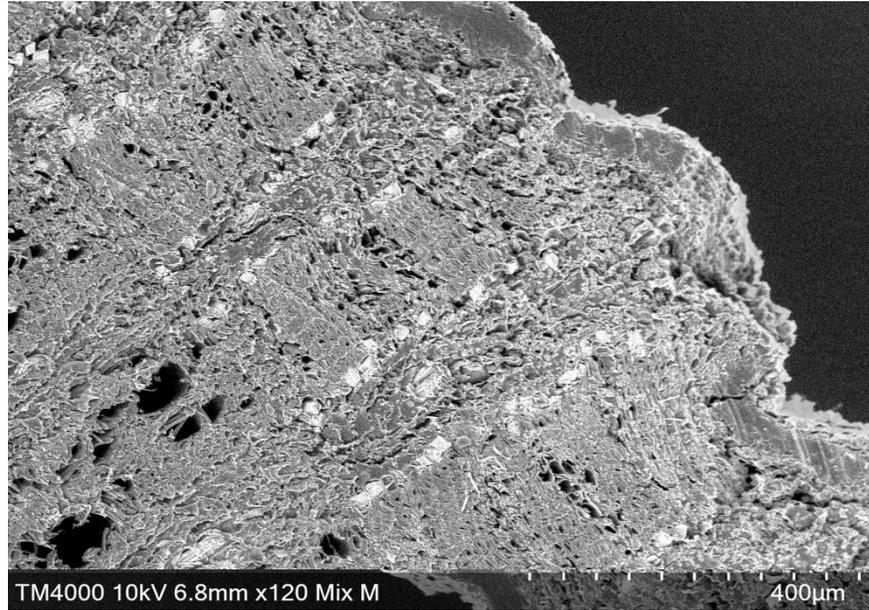
- **Coupe transversale** au sécateur (0,5 cm de hauteur) de l'échantillon frais ;
- **Rafraichissement** en surface (lame de rasoir) ;
- **Cryo-fixation** (vapeurs d'azote pâteux) ;
- **Sublimation** (5 min à -90°C) ;
- **Métallisation** à l'argon (10 sec à 5 mA) ;
- **Observation** au Cryo-MEB (Hitachi SU 8230 équipé d'un Quorum PP3000 t).



Anatomie des racines



Ceps asymptotiques

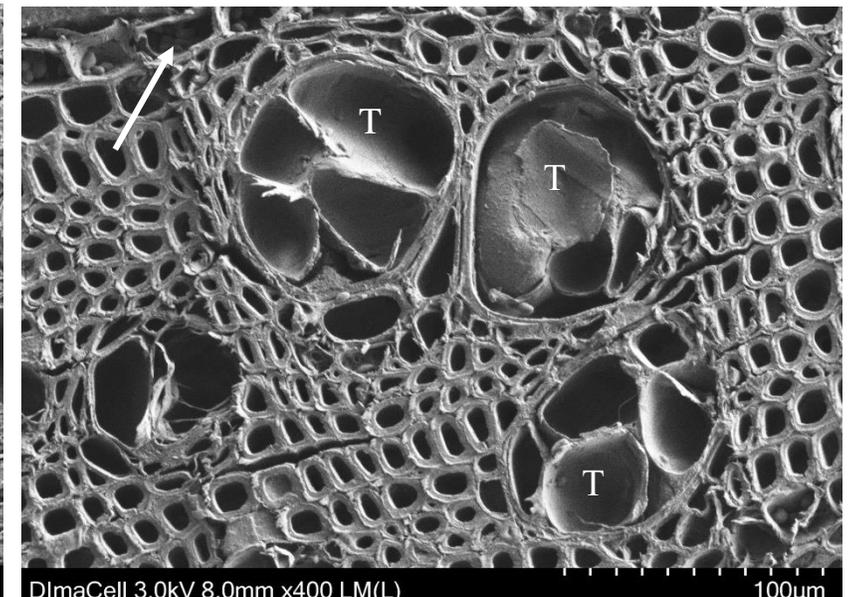
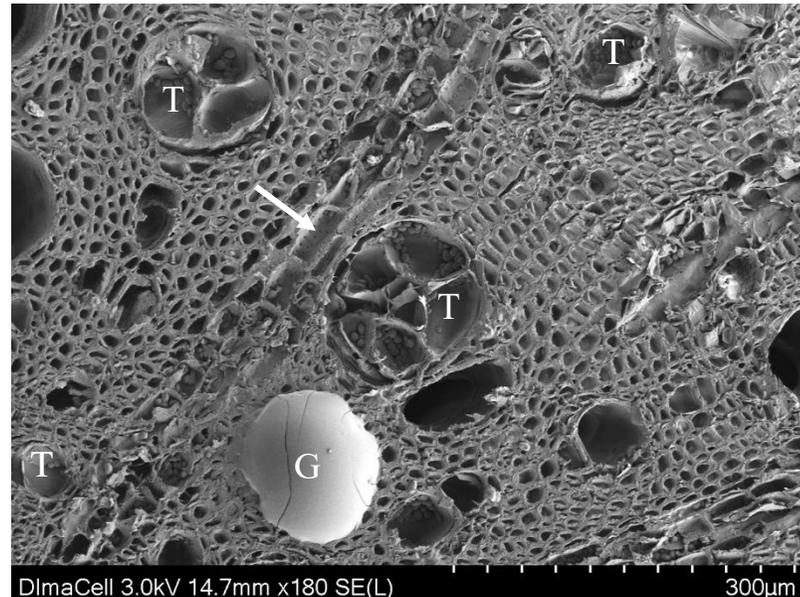
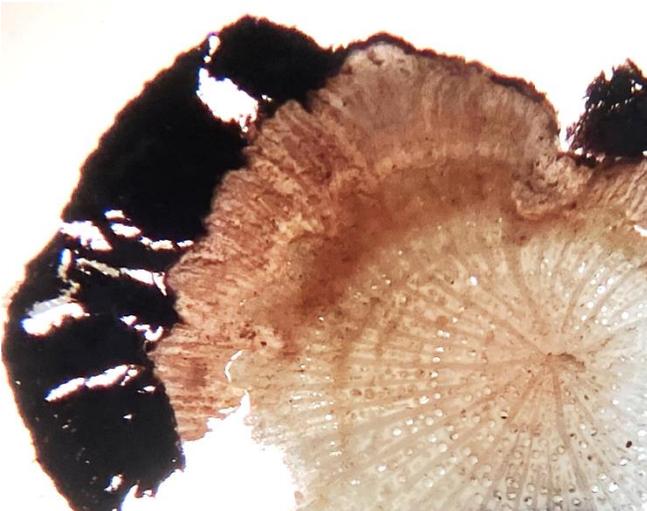
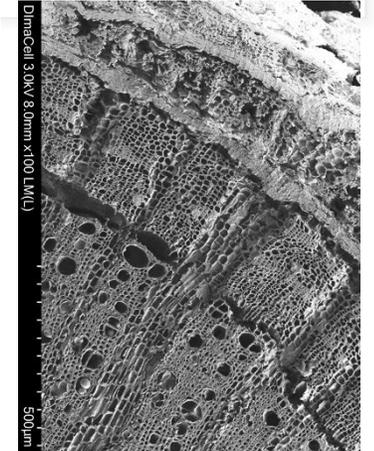
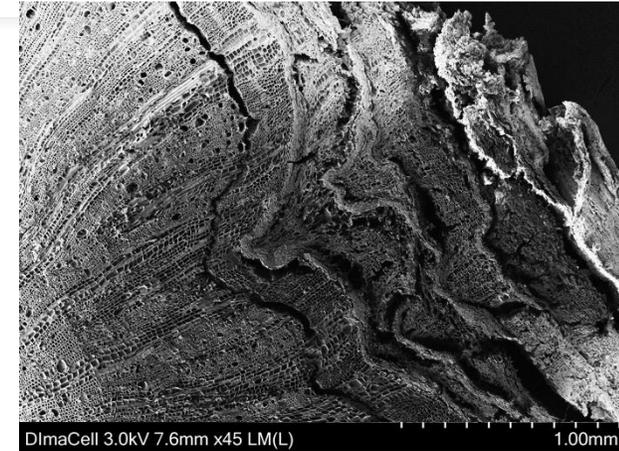
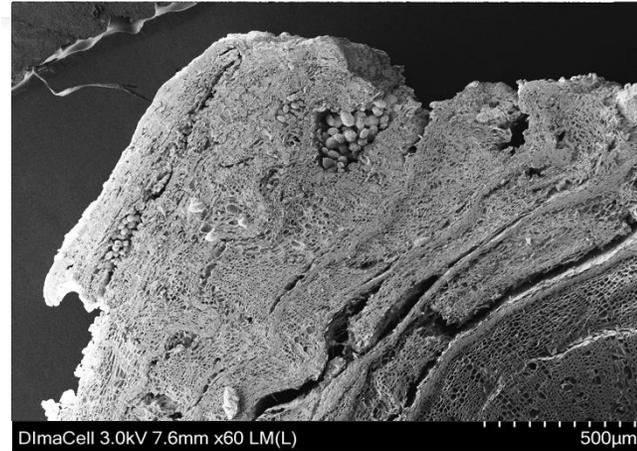


Liber II et **vaisseaux** du bois II **fonctionnels** ; nombreux **amyloplastes** dans les rayons libériens et ligneux

Anatomie des racines

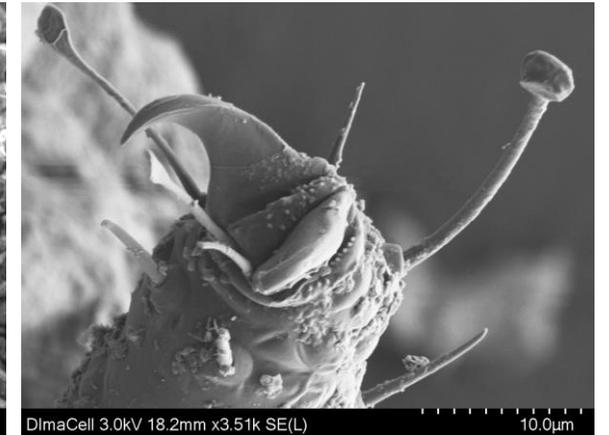
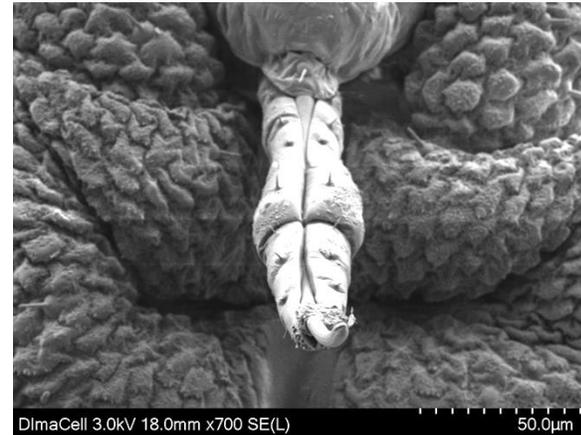
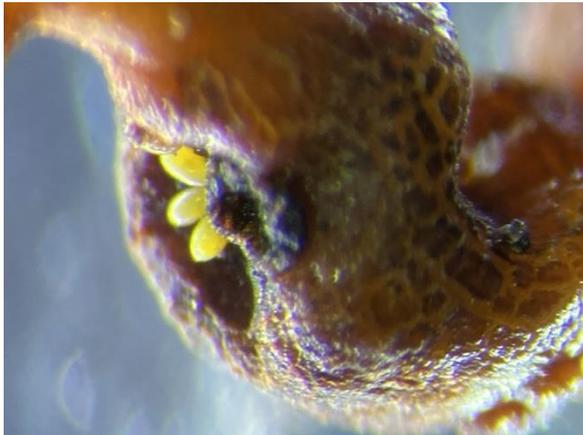
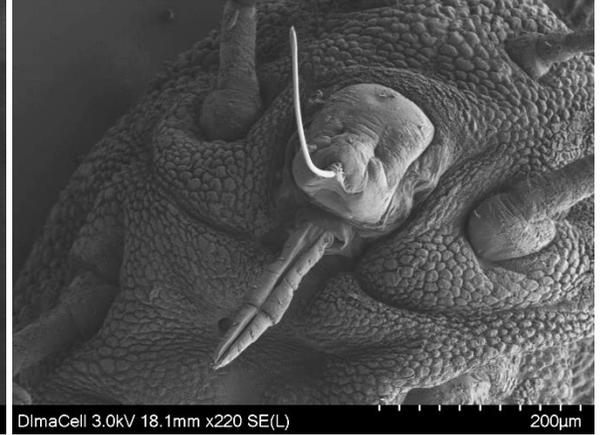
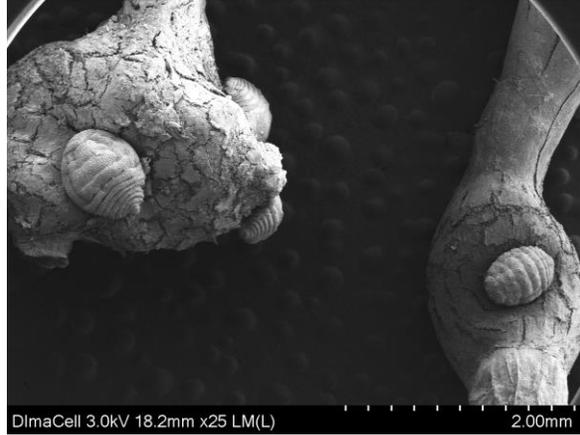


Ceps dépérisants



Accumulation de couches de **Liber II altérées** ; **vaisseaux thyllosés** ou **gommosés** ; **peu/pas d'amyloplastes**

Observation des radicelles



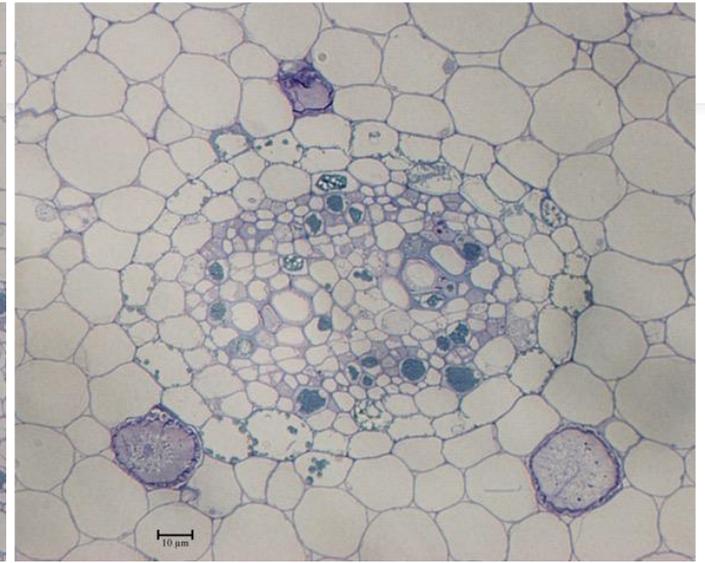
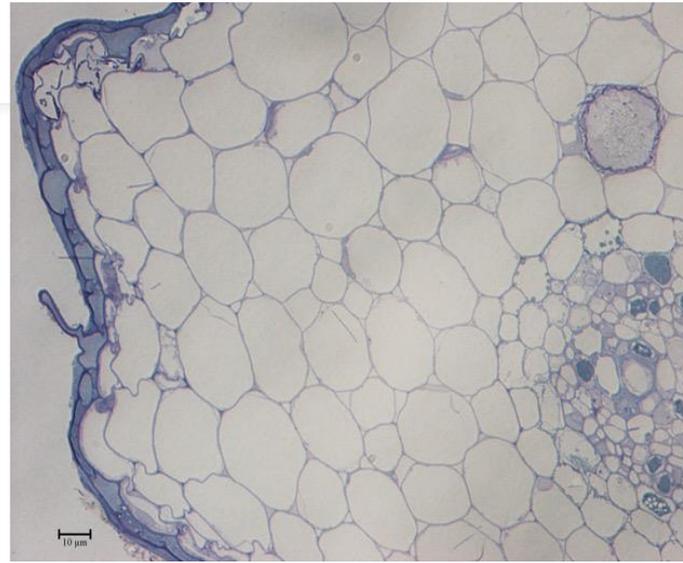
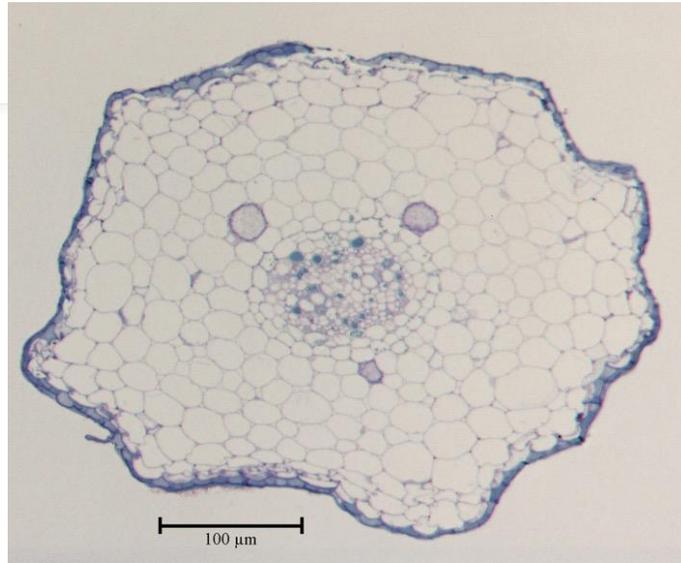
Galles (nodosités) **phylloxériques** et présence de **femelles aptères** sur les radicelles de ceps asymptotiques et dépérissants

Anatomie des racines

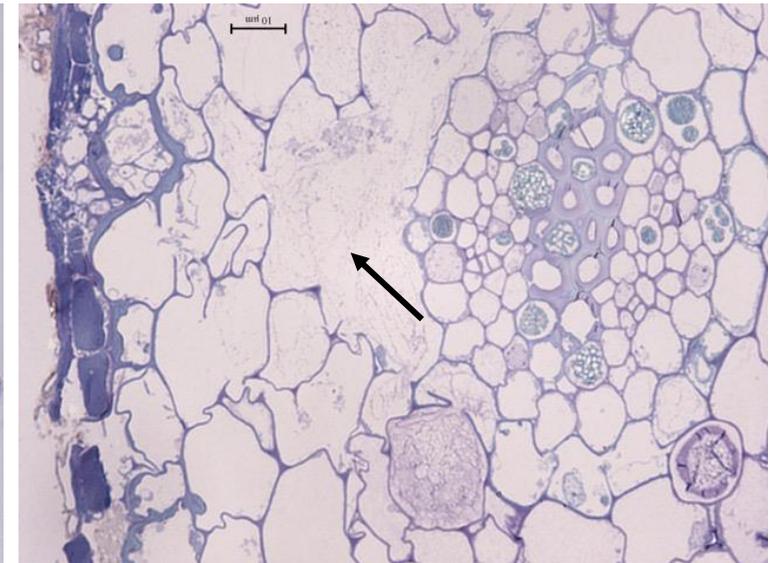
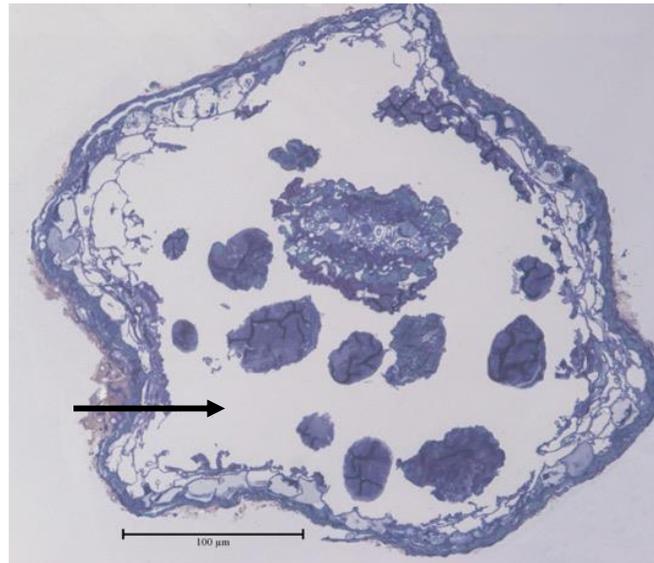
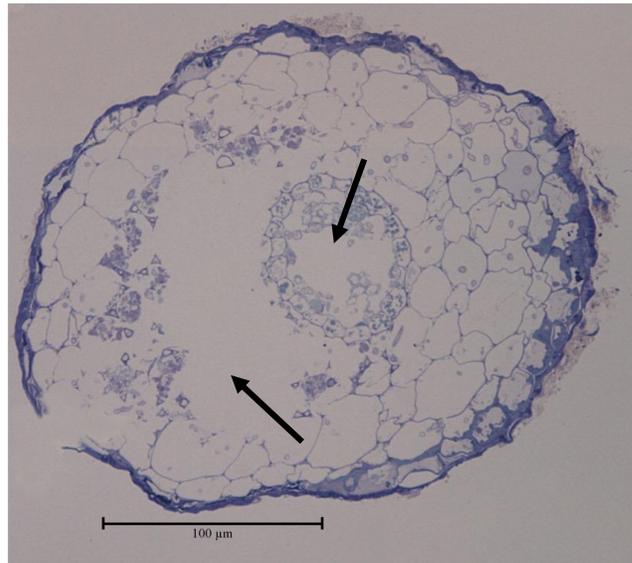


Coupes semi-fines (0,5 µm d'épaisseur) - coloration bleu de toluidine

Ceps asymptomatiques

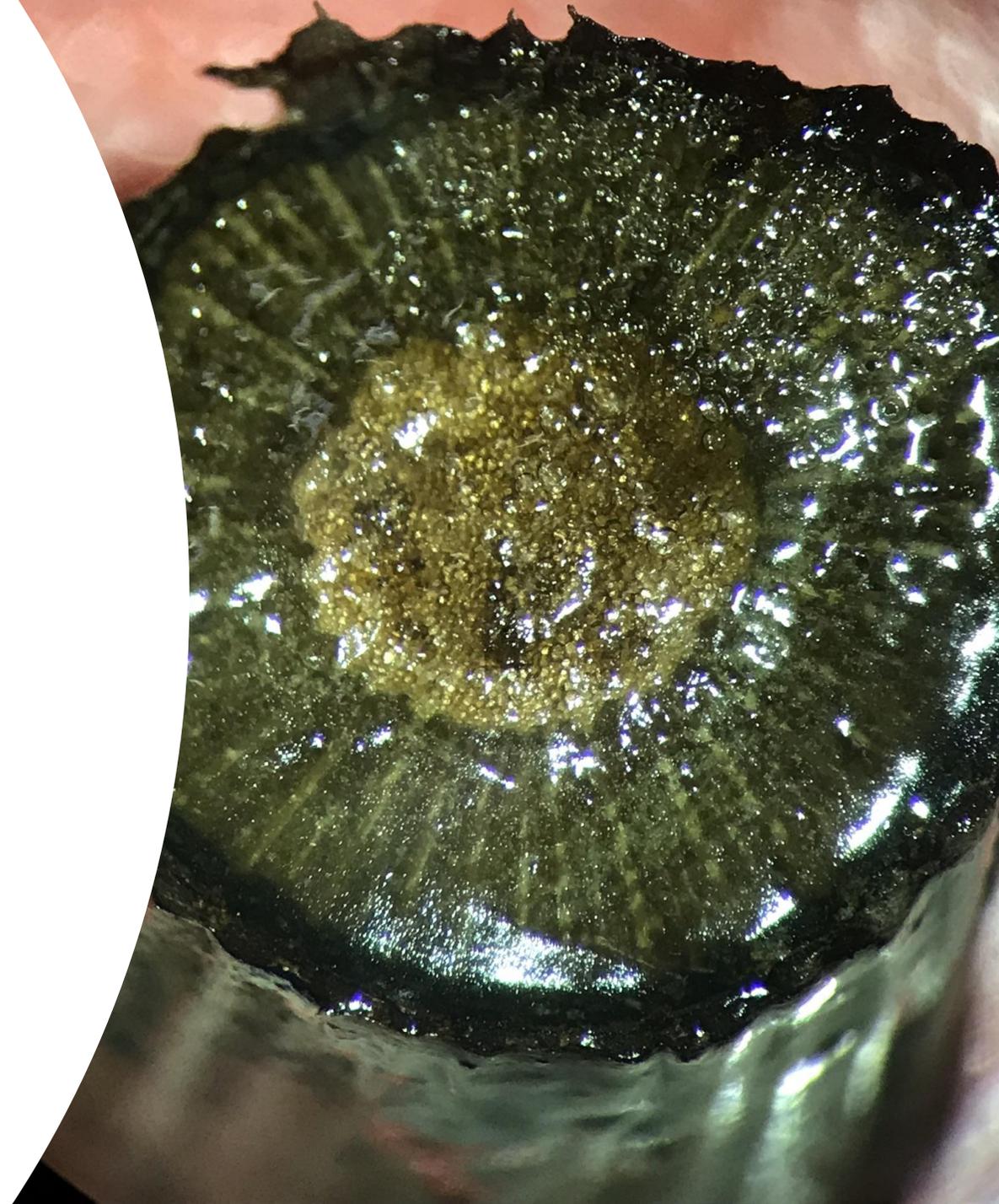
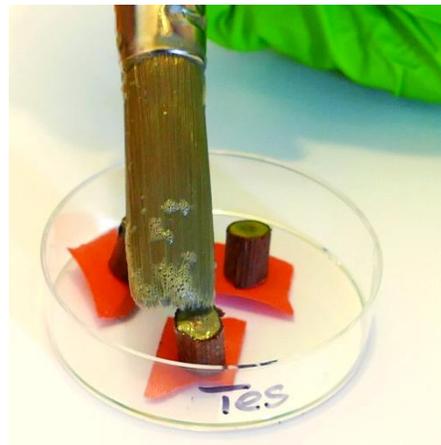


Ceps dépérissants



Anomalies structurales tant dans le **cortex (lacunisation parenchymateuse)** que dans le **cylindre central**

Appréhender l'effet ou la répartition de
méthodes de lutte potentielle
ou proscrite.

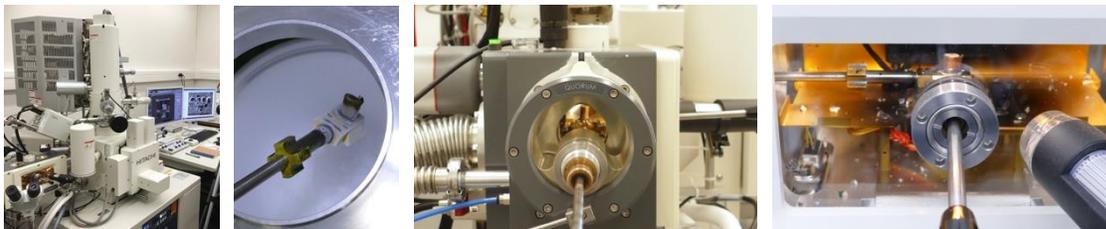


Approches et méthodes



Microscopie électronique à **balayage**

- **Coupe transversale de sarment** au sécateur (0,7 cm de hauteur) + rafraîchissement de surface (lame de rasoir)
- **Application du traitement (badigeon)** en surface de la plaie
- Séchage (1h température ambiante)
- **Cryo-fixation** (vapeurs d'azote pâteux)
- **Sublimation** (5 min à -90°C)
- **Métallisation** à l'argon (10 sec à 5 mA)
- **Observation** au Cryo-MEB (Hitachi SU 8230 équipé d'un Quroum PP3000 t).

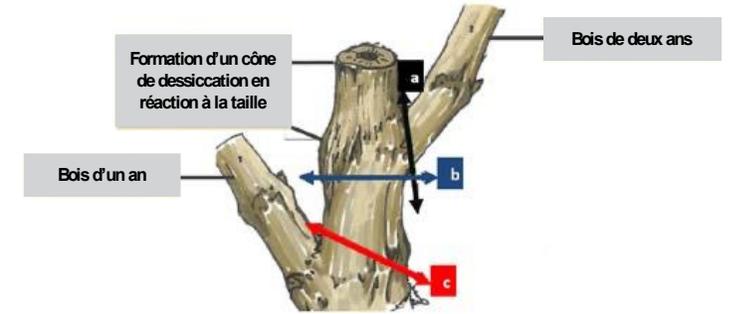


Hybridation *in situ* - microscopie optique à fond clair

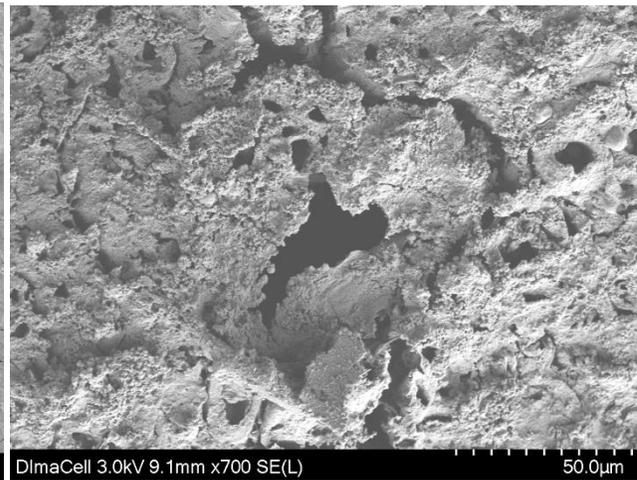
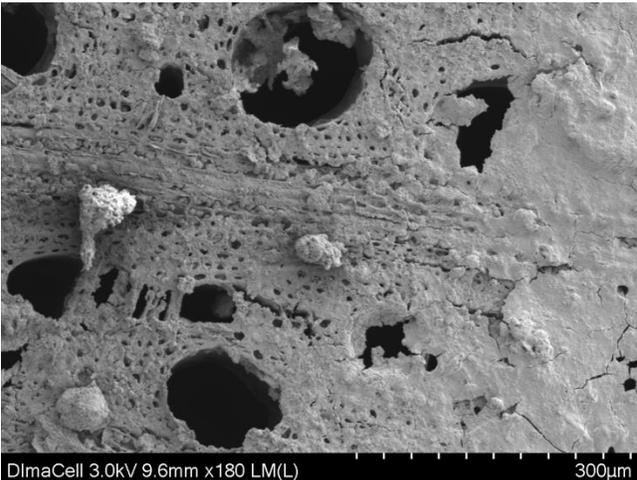
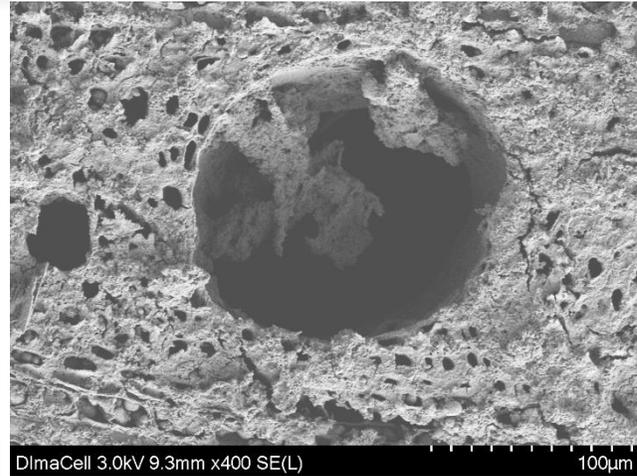
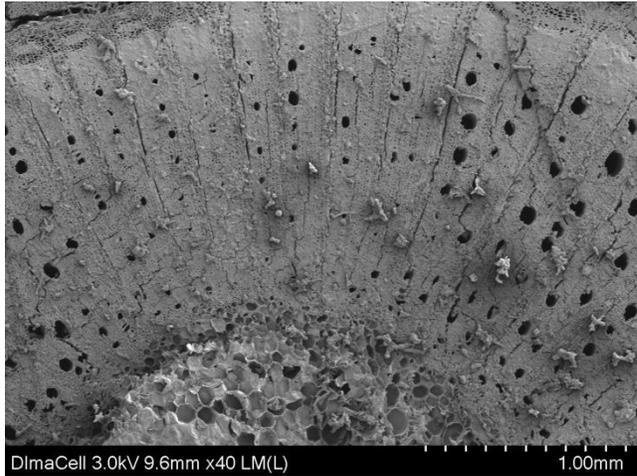
- **Application du traitement sur le cep de vigne** (arsénite de sodium)
- **Echantillonnage** feuilles / rameaux / bois 6 mois post-traitement
- **Fixation** (4% paraformaldéhyde en tampon PBS 1X 10 mM p7,4) 1 nuit à 4°C et **rinçages** (PBS 1X avec glycine 0,1M, 3 x 15 min puis PBS seul 2 x 15 min)
- **Déshydratation** (éthanol 50%, 70%, 95% ; butanol 1 nuit 4°C ; Safesolv : butanol / Safesolv (2v/1v) ; butanol / Safesolv (1v/2v) ; Safesolv pur à température ambiante)
- Imprégnation **paraffine** (Paraplast X-TRA®, Sigma-Aldrich ; 58°C)
- **Polymérisation** à température ambiante en moule (conservation des blocs à -20°C)
- **Coupe** des échantillons au microtome (10 µm d'épaisseur)
- **Déparaffinage** (Safesolv puis éthanol puis eau DEPC), **déprotéinisation** enzymatique (protéinase K, 37°C), **rinçages** (PBS1 X avec 0,2% glycine), **déshydratation** (éthanol 50, 70, 100%).
- **Hybridation** (MIX : formamide déionisé, SSC, sulfate de dextran 50%, Denhardt) ; Sonde (**ARNt marqué à la digoxigénine** 200 à 400 ng / lame)
- **Révélation du signal** (solution de blocage , Anti-DIG PA + substrat NBT+BCIP, à l'obscurité, rinçages Tris-HCl 5min puis eau stérile)
- **Observation** au microscope optique à fond clair (Leica Leitz DMRB, Wetzlar, Allemagne) .



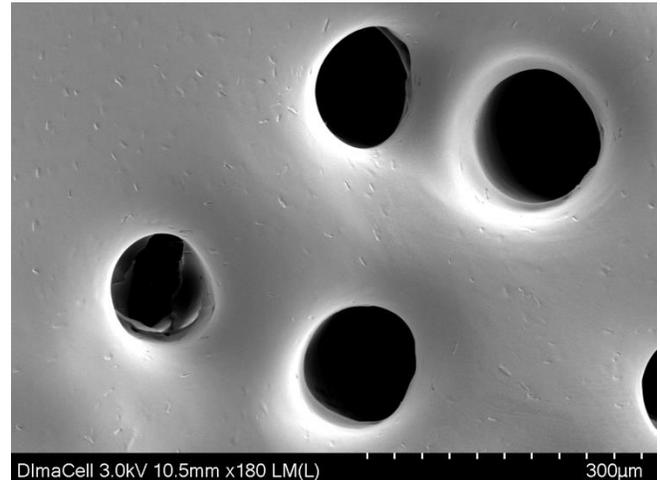
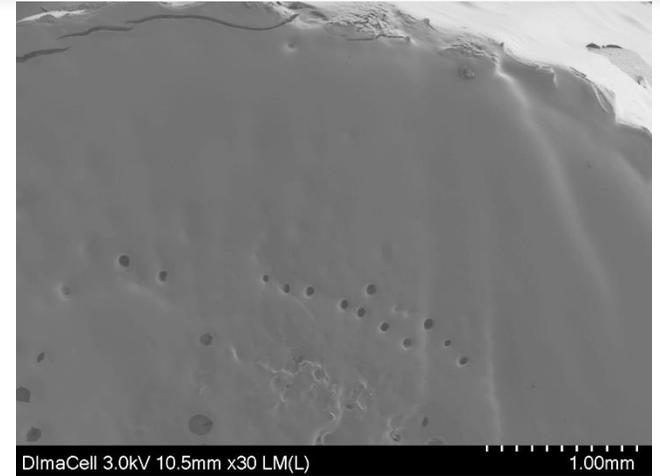
Protection de plaies de taille



Formule 1 – badigeon



Produit commercial – badigeon



Localisation de transcrits liés à la défense

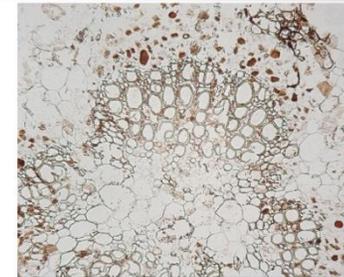
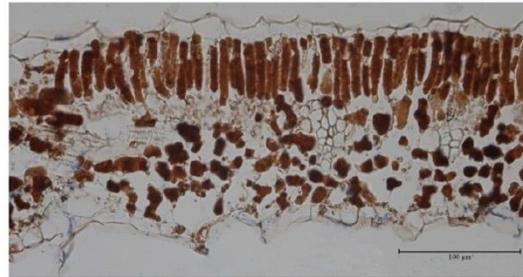
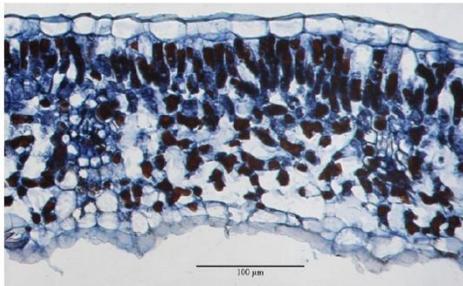
Coupes transversales de limbe foliaire (paraffine – 10 µm d'épaisseur)

Sonde anti-sens Rib

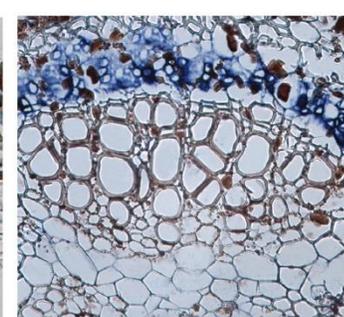
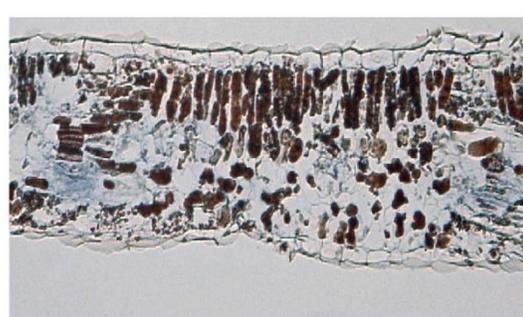
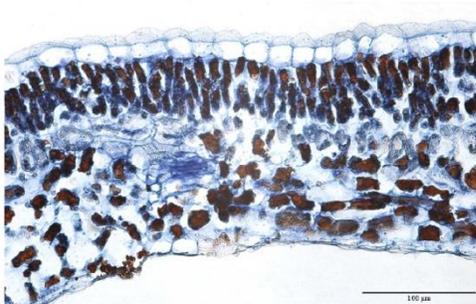
Sonde anti-sens **GST-1**



Ceps NTAsS
Sans symptômes



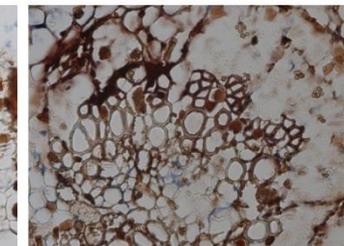
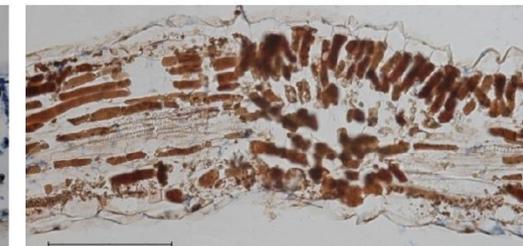
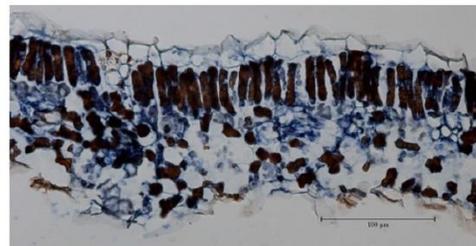
Ceps NTAsS
Avec symptômes



Arsenite de sodium



Ceps TAsS
Sans symptômes



Rib = Sonde ribosomique ;
expression constitutive

GST1 = Glutathion-S-
transférase (Phi) ;
détoxification

ARNt marqué à la DIG , Ac-anti-
DIG couplé à la phosphatase
alcaline + substrat NBT+BCIP.

Source : Magnin-Robert M., Adrian M., Trouvelot S., Spagnolo A., Jacquens L., Letousey P., Harir M., Roullier-Gall C., Clément C., Schmitt-Kopplin P., Vallat A., Abou-Mansour E., Fontaine F. (2017). Alterations in grapevine leaf metabolism occur prior to esca apoplexi appearance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30(12):946-959. DOI : 10.1094/MPMI-02-17-0036-R

CONCLUSION



- ✓ L'**histologie végétale** = un panel de techniques facilitant l'**analyse spatiale** à **différentes échelles** et pour différentes **questions biologiques**.
- ✓ Un point de vue « **imagé** » donc **parlant** (« y'a pas photo » !)
- ✓ Parfois **chronophage** (ex : hybridation $\dot{A}F \dot{L}A\dot{N}T$), nécessitant immanquablement des **mises au point** et confrontée à la **spécificité des tissus végétaux** (ex : autofluorescence des chloroplastes, des parois cellulaires ; présence de composés phénoliques) ou à la **fragilité des microorganismes** (ex : cryo-MEB).
- ✓ **Représentativité** / **coût** pour les techniques les plus résolutive (échantillonnage pour valorisation) = parfois un frein.

Un travail collectif : merci à l'ensemble des collaborateurs !



Sophie TROUVELOT



Lucile JACQUENS



Marielle ADRIAN



Pierre-Emmanuel
COURTY



Laure AVOSCAN



Christine
ARNOULD



Aline
BONNOTTE



Elodie NOIROT



Florence FONTAINE



Philippe LARIGNON



Un immense merci à nos financeurs



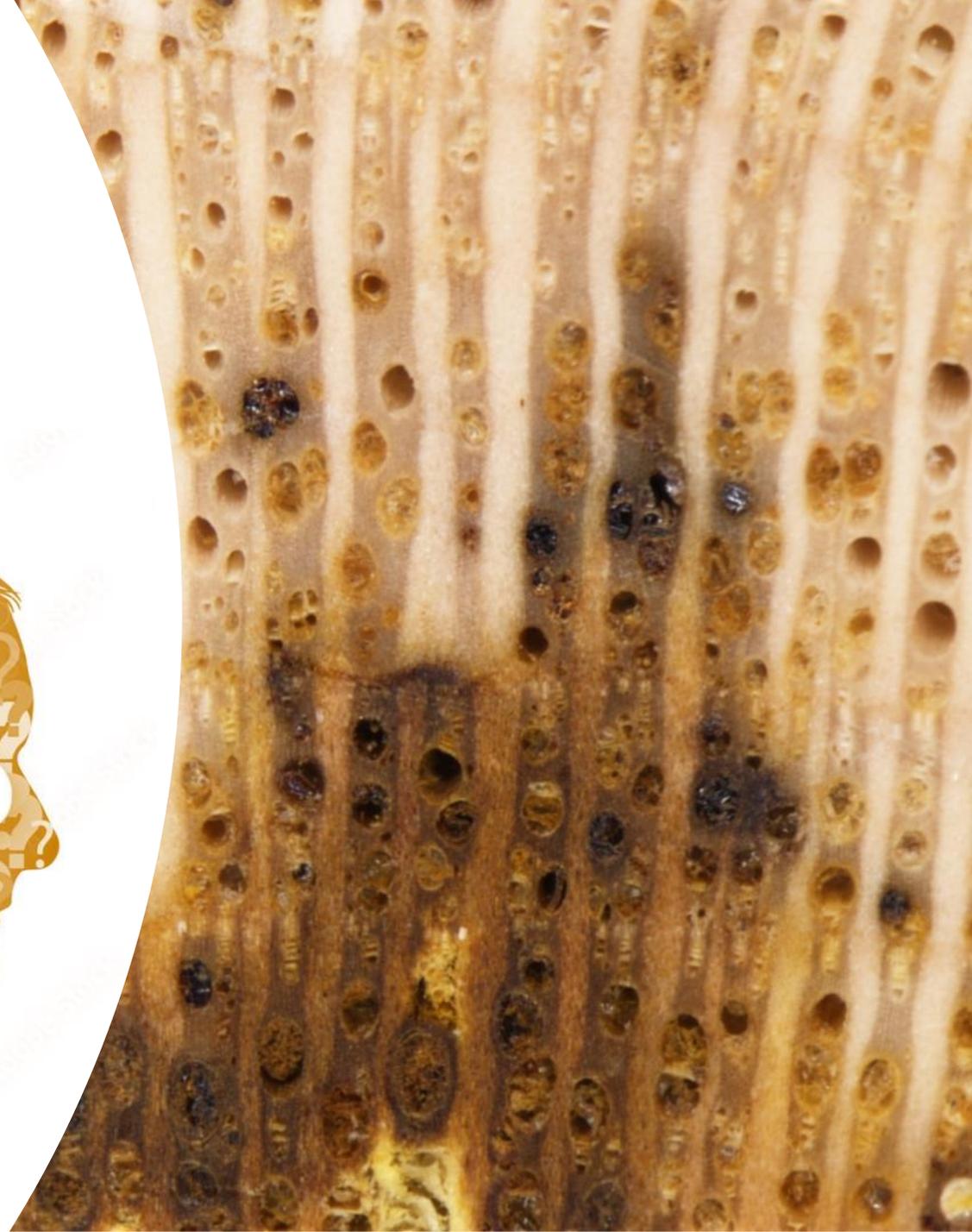
merci

de votre attention !



Sophie Trouvelot, Université de Bourgogne
(Institut Universitaire de la Vigne et du Vin)

sophie.trouvelot@u-bourgogne.fr



Localisation / discrimination *in situ*

de certains **agents infectieux**

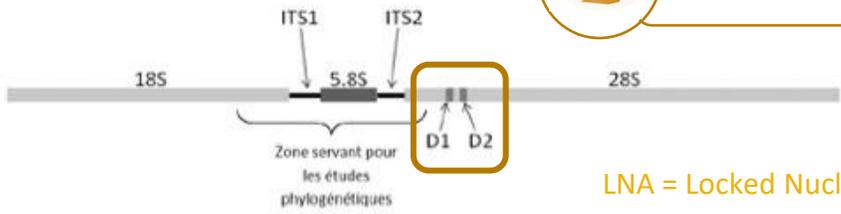
responsables de dépérissement



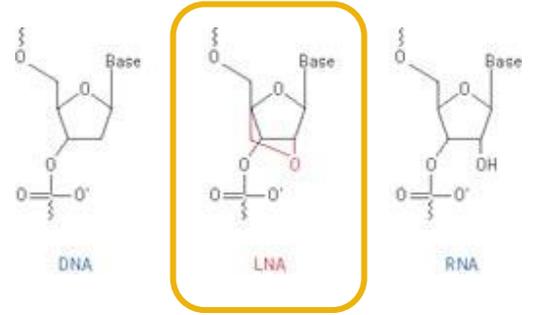
Approches et méthodes



Hybridation *in situ* - microscopie confocale



LNA = Locked Nucleic Acid



« DNA mimics »

Nucléotides avec chaîne carbonée du ribose modifiée par une liaison méthylène entre le groupement hydroxyle en position 2 et le carbone en position 4.

➤ 5 LNA dans une sonde de 20 pb

- Facilite le processus d'hybridation et **augmente la stabilité de l'analogue** (Kubota *et al.*, 2006 ; Cerqueira *et al.*, 2008 ; Thomsen *et al.*, 2015).
- Permet (i) une **augmentation de la spécificité** de la sonde lorsque le LNA est porté par une base spécifique (et les bases l'encadrant) et (ii) une **meilleure résistance aux enzymes de dégradation** des acides nucléiques de type **RNase** et **DNase**.

Espèce ciblée	Marqueur de sonde	Anticorps I ^{aire}	Anticorps II ^{aire} et fluorophore
<i>D. seriata</i>	Bromodeoxyuridine (BrdU) - Exiqon	Souris anti-BrdU - ThermoFisher	Ane anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 647 - Abcam
<i>N. parvum</i>	Biotine - Exiqon	Chèvre anti-biotine - ThermoFisher	Lapin anti-chèvre couplé à l'Alexa Fluor 405 - Abcam



Observation : confocal Leica SP8

- 1 Déparaffinage (SafeSolv)
- 2 Réhydratation
- 3 Protéinase K - 30min à 37°C
- 4 Déshydratation
- 5 Hybridation : une nuit à 45°C
- 6 Rinçages post-hybridation :
SSC 2X à 50% formamide - 45min à 50°C
SSC 1X - 10min à 55°C
SSC 0,2X - 20min à 55°C
SSC 0,2X - 10min à 55°C
PBS 1X - 10min RT
- 7 Solution de blocage - 1h à 37°C
- 8 Ac I - 2h 37°C
- 9 Rinçage en PBS 1X - 3X 10min RT
- 10 Ac II - 2h 37°C
- 11 PBS 1X - 3X 10min RT

Hybridation ΔF ΔNT sur mycélium

Sans sonde

Sonde S-Np (sens)

Sonde AS-Np (anti-sens)

N. parvum

D. seriata

