

Identification des déterminants physiologiques et moléculaires à l'origine de la réponse différentielle d'agrumes diploïdes et polyploïdes vis-à-vis de la maladie du Huanglongbing (HLB).

1. Résumé

Présent dans le monde entier à l'exception du bassin méditerranéen et le Moyen-Orient, le Huanglongbing (HLB), encore appelé citrus greening ou maladie du dragon jaune, est aujourd'hui considéré comme la maladie bactérienne la plus dévastatrice au sein des agrumes cultivés. La bactérie responsable de cette maladie est une alphaprotéobactérie non-cultivable à Gram négatif en forme de bacille appelé *Candidatus Liberibacter* transmise par des psylles *Diaphorina citri* et *Trioza erytreae*. Il existe trois souches de cette bactérie, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas ; Las), *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam ; Lam) et *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf ; Laf).

Une fois infecté par la bactérie responsable du HLB, la réponse de l'arbre est d'induire la synthèse de callose au niveau des pores du phloème empêchant ainsi le passage de la sève élaborée vers les organes puits tels que les fruits ou encore les racines. La conséquence de ce blocage va engendrer des marbrures asymétriques au niveau des feuilles des arbres infectés à cause des produits photosynthétiques comme l'amidon qui vont s'y accumuler. De plus, le HLB va induire un stress oxydatif, caractérisé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sera néfaste pour les arbres. Contrairement aux feuilles, aucun dépôt – voir très peu – de callose n'est observable au niveau des racines justifiant le fait qu'elles soient considérées comme un réservoir car elles seraient lieu de multiplication et de développement de la bactérie. De ce fait, la dégradation des racines observées serait due à une action directe de la bactérie et non indirecte comme au niveau foliaire. Tout ceci va entraîner une perte des feuilles, des fruits mais aussi des racines aboutissant ainsi une diminution de la production fruitière.

Les agrumes sont généralement diploïdes ($n = 9$ soit 18 chromosomes), néanmoins il existe des agrumes polyploïdes, qui se comportent mieux au champ que des variétés diploïdes. La polyploïdie est un phénomène qui a longuement montré des avantages dans le monde végétal. En effet, chez les agrumes polyploïdes, les cellules et organes sont plus gros que chez leurs

diploïdes respectifs. Leur système de défense face aux stress oxydatifs engendrés par des stress biotiques ou abiotiques, est également plus efficace.

De ce fait, dans cette thèse la première étude s'est portée sur l'impact de la ploïdie face à la maladie du HLB, en prenant deux variétés de limettiers (Mexicain 2x (diploïde) ; Tahiti 3x (triploïde)) greffés avec un porte-greffe 2x en faisant des analyses physiologiques, microscopiques et biochimiques.

Cette étude a permis de montrer dans un premier temps que la charge bactérienne était chez les 3x était moins élevée et que la caractéristique anatomique des 3x (tailles des pores du phloème plus grosse) et un dépôt de callose moindre permettraient le flux de sève afin de maintenir l'arbre. De plus, un pouvoir antioxydant était plus efficace chez les variétés triploïdes par rapport aux variétés diploïdes, permettant ainsi l'élimination des ROS induites par la maladie du HLB.

La 2^{ème} étude de cette thèse a été faite sur des porte-greffes citrumelo Swingle 2x et 4x (tétraploïde) puisque depuis plusieurs siècles, les agrumes ne sont pas cultivés de franc-pied mais de manière bi-composite. Ces porte-greffes étaient greffés avec les mêmes variétés 2x et 3x de la première étude.

L'étude au niveau des racines de porte-greffes a permis de montrer que même s'il y avait bien une différence anatomique entre les cellules, pores et organes entre 2x et 4x, il n'y avait aucun dépôt de callose, voire très peu, au niveau du phloème. Néanmoins, l'hybridation in situ à fluorescence a montré qu'il y avait une présence bactérienne plus importante au niveau des porte-greffes 2x par rapport au porte-greffes 4x, expliquant certainement la forte dégradation des racines secondaires chez les porte-greffes 2x. Concernant le pouvoir antioxydant, des analyses électrochimiques et de dosages de polyphénols ont montré un pouvoir plus efficace au niveau des racines de porte-greffes 4x. L'analyse biochimique des polyphénols a également montré une influence de la variété par rapport au taux de polyphénols dans les racines. En effet, si la variété était triploïde, le taux de polyphénols dans les racines 2x et 4x était systématiquement plus élevé par rapport à une association 2x/2x ou 2x/4x.

La 3^{ème} étude a été faite sur les mêmes arbres de la 2^{ème} étude et a été axée sur l'étude de l'expression du génome, complétée par des analyses hormonales et du métabolome.

Les analyses RNAseq ont permis de montrer que la maladie du HLB impactait bien l'expression de certains gènes impliqués dans le développement (acclimation of photosynthesis to

environnement...) ou encore dans la défense des plantes (ascorbate peroxidase 2...). Après cette analyse, une création de réseaux de gènes a été faite et les résultats ont montré qu'une sur ou sous-expression de gènes était plus retrouvée dans les catégories concernant la synthèse de peptide, d'expression des gènes, la réparation d'ADN et la phosphorylation.

Les résultats des dosages hormonaux ont montré qu'en relation avec la littérature, le taux d'acide salicylique (hormone clé de la résistance systémique acquise) augmentait considérablement chez les plants infectés par la bactérie responsable du HLB.

Enfin, bien que les résultats du métabolome soient préliminaires, les résultats qu'il y avait un bien un impact de la maladie, de la ploïdie du porte-greffe et qu'il existait bien une relation entre greffon et porte-greffes.

2. Abstract

Considered as the most devastating bacterial disease in cultivated citrus, Huanglongbing (HLB), also called citrus greening or yellow dragon disease in French is present all over the world except in the Mediterranean basin and in the Middle East. The bacterium responsible for this disease is a non-cultivable gram-negative bacillus-like alphaproteobacteria called *Candidatus Liberibacter* transmitted by psyllids *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae*. There are three strains of this bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas; Las), *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam; Lam) and *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf; Laf).

Once infected by the HLB bacterium, the tree's response is to induce callose synthesis in the phloem pores, thus preventing the passage of the elaborated sap to the sink organs such as fruits or roots. The consequence of this blockage will be asymmetric mottling of the leaves of infected trees due to the accumulation of photosynthetic products such as starch. In addition, HLB will induce oxidative stress, characterized by reactive oxygen species (ROS), which will be detrimental to the trees. Contrary to the leaves, no deposition - or very little - of callose can be observed in the roots, justifying the fact that they are considered as a reservoir because they would be the place of multiplication and development of the bacteria. Therefore, the degradation of the roots observed would be due to a direct action of the bacterium and not indirectly as at the foliar level. All this will lead to a loss of leaves, fruits but also roots, thus leading to a decrease in fruit production.

Citrus fruits are generally diploid ($n = 9$ or 18 chromosomes), nevertheless there are polyploid citrus fruits, which behave better in the field than diploid varieties. Polyploidy is a phenomenon that has long shown advantages in the plant world. Indeed, in polyploid citrus, the cells and organs are larger than in their respective diploids. Their defense system against oxidative stresses generated by biotic or abiotic stresses is also more efficient.

Therefore, in this thesis, the first study focused on the impact of ploidy against HLB disease, taking two varieties of lime trees (Mexican 2x (diploid); Persian 3x (triploid)) grafted with a 2x rootstock by doing physiological, microscopic and biochemical analyses.

This study showed that with qPCR, the number of bacteria was lower in the 3x and that the anatomical characteristics of the 3x (larger phloem pore size) and a lower callose deposit would allow the flow of sap to maintain the tree. In addition, antioxidant capacity was more effective in triploid varieties compared to diploid varieties, allowing the removal of ROS induced by HLB disease.

The second study of this thesis was done on citrumelo Swingle 2x and 4x (tetraploid) rootstocks since for several centuries citrus trees have not been grown free-standing but in a bi-composite manner. These rootstocks were grafted with the same 2x and 3x varieties from the first study.

The rootstock study showed that although there was an anatomical difference in cells, pores and organs between 2x and 4x, there was little or no callose deposition in the phloem. Nevertheless, fluorescence in situ hybridization showed that there was a greater bacterial presence in the 2x rootstocks compared to the 4x rootstocks, certainly explaining the strong degradation of secondary roots in the 2x rootstocks. Concerning the antioxidant power, electrochemical analyses and polyphenol assays showed a more efficient power in the roots of 4x rootstocks. The biochemical analysis of polyphenols also showed an influence of the variety in relation to the level of polyphenols in the roots. Indeed, if the variety was triploid, the level of polyphenols in the 2x and 4x roots was systematically higher compared to a 2x/2x or 2x/4x associations.

The third study was done on the same trees of the 2nd study and focused on the study of genome expression, completed by hormonal and metabolome analyses.

The RNAseq analyses showed that the HLB disease had an impact on the expression of certain genes involved in development (acclimation of photosynthesis to environment...) or in plant defense (ascorbate peroxidase 2...). After this analysis, a creation of gene networks was done and the results showed that an over or under expression of genes was more found in the categories concerning peptide synthesis, gene expression, DNA repair and phosphorylation.

The results of the hormone assays showed that, in relation to the literature, the level of salicylic acid (key hormone of systemic acquired resistance) was significantly increased in plants infected with the HLB bacterium.

Finally, although the metabolome results are preliminary, the results showed that there was an impact of the disease, of the ploidy of the rootstock and that there was a relationship between graft and rootstock.