



**HAL**  
open science

# La vigne comme holobionte : validité du concept, dynamique temporelle, déterminants environnementaux et application à la définition du terroir microbiologique

Marine Biget

## ► To cite this version:

Marine Biget. La vigne comme holobionte : validité du concept, dynamique temporelle, déterminants environnementaux et application à la définition du terroir microbiologique. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B044 . tel-03628565

**HAL Id: tel-03628565**

**<https://theses.hal.science/tel-03628565v1>**

Submitted on 2 Apr 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialité : Ecologie et Evolution

Par

**Marine BIGET**

**La vigne comme holobionte: validité du concept, dynamique temporelle, déterminants environnementaux et application à la définition du *terroir microbiologique***

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 02 Décembre 2021

Unité de recherche : **UMR CNRS 6553 ECOBIO**

## Rapporteurs avant soutenance

Marc Buée  
Pierre-Emmanuel Courty

Directeur de recherche, Université de Lorraine  
Chargé de recherche, Université de Dijon

## Composition du Jury

Président :

Marc-André Selosse

Professeur du Muséum, MNHN Paris

Examineurs :

Lucie Zinger

Maître de conférences, ENS Paris

Rapporteurs :

Marc Buée  
Pierre-Emmanuel Courty

Directeur de recherche, Université de Lorraine  
Chargé de recherche, Université de Dijon

Directeur de thèse :

Philippe Vandenkoornhuysse

Professeur des Universités, Université de Rennes 1

Co-directrice de thèse :

Véronique Chable

Ingénieure de recherches, INRAE

Co-directrice de thèse :

Sabrina Pernet

Responsable de culture, Château Palmer

Invité(s) :

Cendrine Mony

Maître de conférences, Université de Rennes 1



---

LA VIGNE COMME HOLOBIONTE :

VALIDITÉ DU CONCEPT, DYNAMIQUE TEMPORELLE,  
DÉTERMINANTS ENVIRONNEMENTAUX ET APPLICATION À  
LA DÉFINITION DU *TERROIR MICROBIOLOGIQUE*

---



## Merci, Merci et ... MERCI !

### *Quelle histoire ...*

Que m'est il passé par la tête... débiter une thèse à l'aube de mes 30 ans alors que la plupart des gens autour de moi commencent à "grandir"... *seuls les vrais savent!* Certes il aurait été beaucoup plus simple pour moi d'acheter enfin ma modus tant désirée et le labrador qui va bien... mais il n'en a pas été ainsi! Avec le recul de ces 3 ans révolus, je me rends compte que j'ai toujours voulu faire une thèse... même si durant ces 3 ans, je suis passée par des hauts, et beaucoup de bas, ... qu'il est bon, une fois le travail titanesque accompli, de se retourner et de se rendre compte que l'on a tout de même réussi à franchir cette sacrée montagne... malgré le nombre incalculable de fois où l'on m'a entendu me plaindre (*ranwouenner*), ce fut un plaisir de travailler sur ce projet mais surtout avec l'ensemble des gens impliqués de près ou de loin dans ce trek!

### *Etes vous prêt pour les remerciements?*

*Je m'excuse d'avance car je suis connue pour ma logorrhée "verbale à la plume"*

*(Philippe et Cendrine ne le savent que trop bien ... "paragraphe à résumer en une phrase" <3) ...*

*On m'a dit que c'était ma thèse et que je pouvais écrire ce que je voulais... alors j'en profite!*

*"Ce qui se conçoit le mieux s'explique clairement" ... Qu'est ce que j'ai pu l'entendre celle-là... désolée papa mais pour le coup, je vais m'étendre à la juste valeur de la gratitude, de l'amitié et de l'amour que j'ai pour les personnes qui suivent!*

Je souhaite remercier en premier lieu mes encadrants: Philippe, Cendrine et Véronique.

Philippe, tu m'as donné ma chance de découvrir le monde "merveilleux" de la génomique environnementale il y a 6 ans maintenant... Tout d'abord en tant qu'ingénieure puis en tant que doctorante malgré mes connaissances fondamentales encore bien fragiles. Tu as su me faire confiance, apprécier mon tempérament un peu "tout feu tout flamme" et me redonner confiance en moi quand, tout au long de cette thèse, je doutais terriblement. Merci pour le terrain, la science, l'histoire du Kentucky 31 ... et puis, comme tu le sais, il n'y a pas que la science ("tu sais, la fameuse "\*\*\*\*\* intello"), notre passion bière, BD, chaussette, blague au second degré (ah non, ça c'est que moi), etc... (d'ailleurs, j'en profite pour te dire que j'ai toujours 13 pintes en crédit...). Merci Philippe, ce n'est pas sans émotion que j'écris ce paragraphe!

Cendrine! Comment te remercier pour l'aide IMMENSE que tu as su m'apporter tout au long de cette thèse et d'autant plus que tu n'étais pas "officiellement" ma co-encadrante... qu'il en soit ainsi sur les papiers officiels, moi, je sais à quel point il m'aurait été impossible de réaliser cette thèse sans ton aide! M'apprendre les bases de la biogéographie (j'y suis presque ...!) et de l'écologie des communautés, m'aider avec R en début (et milieu...) de thèse, le terrain, corriger/écrire les articles/rapports...etc... et puis, pour les petits cadeaux ramenés à chaque rentrée de tes vacances (bière centrée!), les gâteaux, les bouboules déposées avec parcimonie (ou presque) sur mon bureau, pour la compréhension de mes blagues en réunion (le fameux 2nd degré!), bref, pour tout cela, Merci infiniment!

Véronique, un grand merci pour la vision alternative à la recherche fondamentale que tu as su me montrer. J'aime énormément la vision que tu as de la recherche, tu travailles en collaboration étroite avec les acteurs et promeus une façon de produire et de consommer plus responsable... Comme tu m'as dit, il n'y a pas longtemps, en parlant de ton travail, "*ce n'est pas du travail à mes yeux, c'est mon acte militant*". Je retiendrai cela encore longtemps!

Je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux et qui, je l'espère, prendront plaisir à lire ce manuscrit: Marc Buée, Pierre-Emmanuel Courty, Lucie Zinger et Marc-André Selosse.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Christophe Mougel, Achim Quaiser, Sabrina Pernet et Jean-Michel Florin pour leur écoute, leurs conseils et leurs réflexions pertinentes durant les deux comités de thèse.

Un grand merci à l'ensemble des partenaires impliqués dans cette thèse!

Merci au personnel et stagiaires de Château Palmer pour l'aide durant ces 3 ans de thèse que ce soit lors des campagnes d'échantillonnage, de mes demandes intempestives d'informations, de nos conversations ou encore pour mes demandes administratives! Merci à Sabrina, Thomas, Sylvain, Oriane, Hélène, Vincent, Olivier, Alba, Sandrine et à tout Palmer! rien n'aurait été possible sans vous tous! ... Et merci de m'avoir permis de goûter des vins tels que les vôtres! Vous formez une très belle équipe!

Merci également à David Pernet pour sa disponibilité, sa curiosité, ses remarques toujours très pertinentes lors des présentations.

Merci à Thibaud de Salettes pour les discussions constructives et pour avoir mis en place la plus belle expérience de cette thèse avec l'aide de Isabelle Omon (les plantes chimériques), même si d'un point de vue pépiniériste, cette expérience n'avait vraiment aucun sens!

Merci à Didier Foret pour son aide lors de repérage en sous-marin dans son véhicule climatisé (il faisait 40°C à l'ombre... je n'avais pas de clim...).

Merci à Hélène et Dorian de Château Latour pour leur participation à ce projet de thèse, leur aide lors de l'échantillonnage à Latour, et leur intérêt gratifiant durant mes présentations!

Encore merci à tous pour votre engagement, votre passion pour la vigne et pour une viticulture durable! Je sais que vous allez lancer de nouvelles thèses brillantes! Je vais suivre cela de près!

Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire ECOBIO, pour leur aide, les rires et les discussions aux détours d'une porte!

Merci notamment à Olivier pour son aide précieuse durant les campagnes d'échantillonnage, on a passé de si bons moments malgré nos divergences musicales! Merci aussi à Achim pour son bon coup de pioche en échantillonnage! Spéciale dédicace à notre cher jeune retraité JP Ca-U-dal pour son rire communicatif, sa bonne humeur, les discussions diverses! Par contre, jamais je ne te remercierai pour la "Quintessence"... sois en sûr! Merci à tous les gestionnaires d'ECOBIO pour l'aide lors de mes "AAAHHH je dois commander ce truc en urgence." ou des "GRRR j'ai oublié les OM..."... Merci à vous tous! Vous êtes tous VITAUX au bon fonctionnement de l'unité et vous méritez d'être mille fois remerciés!

..Sans oublier mes 3 affreux compères ... Isabelle, Bertrand et Patricia ! Ralala, vous êtes des sacrés rigolos et vous le savez, j'aime ça! Vous avez fait de ces 3 ans, une franche partie de rigolade et heureusement que vous étiez là! A coup de "madame biget", de petites attentions en tout genre, de projectiles mous à travers les pièces, d'entente musicale (bon avec Bertrand seulement...!), de rires, de "piapiatage"! Sans oublier les fameuses affiches "wanted" placardées dans tout le labo... J'espère vraiment que vous trouverez la personne recherchée "dead or ...dead" qui a sali ostensiblement vos bureaux à coup de tampons encrues pour une sombre histoire de sonate en La mineur pour piano... et mon Patoch, mon animal de compagnie offert par cette belle team!

Merci également aux collègues de l'université de Nanjing en Chine: Thanks Tingting, Ning et Qicheng for your useful help in data analysing and for the stimulating discussions we had! Even at 8 000 km and

several hours each other! Ning, thanks a lot for the help during the sampling campaigns in France! It was a real pleasure to meet you all!

Un grand merci également à Sophie, July et Romain de GEH (EcogenO updated) pour leur aide dans la préparation des libraires et les séquençages... mes 5 000 PCR (au moins...) (merci d'ailleurs aux thermocycleurs d'avoir tenu le coup!) auraient été bien inutiles sans votre intervention dans ce gros projet et sa douzaine de séquençages (...)! Un merci également à Amandine, Marc et Jean pour les années GEH et Marc, merci pour ton aide en début de thèse face à mes reads mixés récalcitrants! Merci à toute l'équipe « rétine » de Nantes pour m'avoir soutenu au tout début de ma « carrière » et pour leur amitié !

Merci aussi aux stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer! Adèle, merci infiniment pour l'aide au labo! Tu es réellement douée et autonome (malgré le lockdown de mars 2020...) Tu sauras briller en thèse, je ne me fais aucun souci pour toi! Paola (Koala ,Paloma, Poala,...), merci d'avoir su redonner du souffle à ce bureau 112 bien morose post-confinement! Merci aussi pour tous les post-it débiles posés sur mon bureau! Te voilà partie pour ...une thèse sur le microbiote de la vigne ! N'hésite pas si tu as besoin de mon maigre savoir!

Tiens, en parlant du bureau 112 girl powa ... QUELLE TEAM !

Lucie chérie, DJ E.V.E, Lorine, Djadja (léa), Claire et Solène. Merci les filles! Je vous aime fort! Que de débuts sur les "chapeaux de roue" (boomeuse #tonton) avec vous! Ce qui se passe dans le bureau 112 , reste dans le bureau 112! on passera donc les détails de toutes les conneries, ranwouennage, étirements, poirier, MEM (? orthographe toujours incertaine), qui ont eu lieu dans cet antre de l'enfer! Que c'était bon d'être avec vous! Même si le départ de certaines et le covid ont eu raison de la déraille qui régnait dans ce bureau (ma thèse et sa finalisation remercient cependant cette baisse d'activité extra-scolaire!), je garde nos moments comme les plus beaux moments de mes années "estudiantines"(même après les courses de poubelles place de la liberté à Brest! Et ça, ce n'est pas rien!). Vous êtes et resterez des amies à qui je tiens énormément!

Un grand merci à Lou, notre "girl power" à barbe ( jean michel jeux de mot!). Même si tu parles bcp trop, et trop sérieusement, que ton parfum m'irrite les naseaux, tu m'es très cher et tu fais que ce labo n'est pas un endroit ordinaire!

Merci à Victor qui est un des derniers survivants de ce bureau à l'heure où j'écris ces remerciements!! Il faut du courage pour débarquer dans ce bureau de filles "à fort caractère"! Bravo!

Un grand merci aussi aux copines de DZ! Anne-Laure, Christelle, Maureen, Anne, et Arlet', Marge! Plus de 20 ans (pour les plus vieilles amitiés) que l'on se connaît, que l'on se soutient, que l'on rigole ou s'engueule et que l'on écume les bars du 2-9! Vous me connaissez par cœur même, mes doutes, mes faiblesses! Vous avez toujours été là pour moi et je ne serais pas la personne que je suis sans vous! Nous avons grandi ensemble, et ces amitiés sont irremplaçables <3

Sans oublier les copains de "tout partout"! On rigole, on communique devant des concerts, on sirote des mousses, et c'est bien le plus important dans la vie! Chers amis, ne m'en voulez pas si j'en oublie, j'ai le cerveau en gruyère depuis 3 ans et une mémoire déjà bien défaillante depuis des années!

Carin, mon bon sac à lich, nos 2h de téléphone tous les 6 mois sont un élixir de jeunesse! Mes parisiens, néo-nantais : Cath, Guillaume, Bastien (pro des modèles nuls...) ! Mon bon Mabien Fahé, égérie du brocéliande. Mon cher et tendre ami Arnaldos el débilos rigolos maximal! Ma chère amie Lizouki,



princesse \*\*\*\*\*, qui m'écoute, me conseille et me fait rire depuis bien des années! Elise Bourgeon, ma brestoïse et mes débuts à la Fac ! Sarah, Waldeck et juju pour nos aprem goûter! Mon bon Antoine, el gros sapeur au cœur tendre! Merci d'être là pour nous, pour tous les pompiers du 35! Même si tu crées des complexes chez certains d'entre nous (*comme atteindre la faïence...*)! Les gentils cap'tab' pour l'amour de l'apéro et de la musique. Papa Matt, Dimitrick, Bench', Marion, Schrek, Lulu-cille, Aude, Yffic, Birek, Rony folie, le tourduf team, vous êtes à mes côtés depuis tant d'années!

Enfin et surtout Merci à mes *Alphonse Guérines and the Chlamydias*.

Je vous aime! Je n'aurais jamais tenu ces 3 années sans vous et notre *band*!

Fanny, Laura et Lucie, quelle team! Entre nos "thés-crêpes" qui dérapent dès 16h, nos parties de Trivial-pour-cuite qui en suivent (*le Nil, la Tour Eiffel, Pompidouuu...*), nos weekend détox durant lesquels on "*Lamballe en y allant Dolo-dolo!*" Nos apéro, nos discussions profondes,...avec vous, je me sens moi même et vous êtes indispensables à ma vie et à mon équilibre. Fannos, ma voisine de 86 pas, merci pour nos Mardis bière pour décompresser de la semaine (oui, oui, il faut décompresser de 2 jours!) avec une fin pile à 21h . Nos ballades autour du tier-quar , les discussions et les conseils avisé de Tata "S\*\*\*\*".

Loulouta 3000, merci pour tout! Tu as été tellement présente, toujours là pour m'écouter, me conseiller ou simplement scroller une appli très intéressante *peinardos la guitara* le dimanche soir! et puis, on ne va pas se mentir, ma belle cu-cupidon, je n'aurais jamais vraiment rencontré Charly sans toi!! Tu vois comme notre vie a changé en peu de temps, comme on est heureuses! On le mérite, tu le mérites!

Lucie, oh ma chérie... merci... quelle rencontre, un soir d'été à la BU (bon ok, au *ptit bar*)... notre passion commune pour le houblon et les cacahuètes nous a rapproché, tu as pris mon numéro de GSM ("*Marine thfiertkjfd*"), puis bah, on s'est installées ensemble en coloc au début de la thèse! Je ne pensais pas possible de rencontrer quelqu'un qui me ressemble autant et avec qui je me sente si proche en l'espace d'un instant! Tu as toujours été là pour moi, tu as veillé sur moi durant mes 6 premiers mois de dérive sans jamais me le montrer (même en lavant la moquette!) ... Merci pour tout tout tout , *el mini dragùn*!

Que dire pour ma famille... les remercier simplement... ce serait bien mince... Essayons tout de même. Maman, papa, vous êtes des parents en or (*on parlera des détails en off cependant...!*). Votre éducation est pour moi un modèle à suivre. Vous m'avez toujours laissé faire mes propres choix, vous m'avez soutenu même après mes erreurs, sans jamais me juger, toujours dans la pédagogie, la diplomatie. "*Avant j'avais des principes, maintenant j'ai des enfants*", n'est ce pas Nono ! Vous êtes tendres, drôles, patients, compréhensifs... merci pour les dizaines de tours de correction de ce manuscrit aussi! je vous aime terriblement et j'espère que vous le savez!

Gael, mon potibière, mon cher frère! Je tiens d'abord à célébrer nos 1 an sans prise de bec et guerre froide! Merci d'être là aussi ! Tu es un sacré personnage mais je serais bien triste à Rennes sans toi! Ne serait-ce que pour aller chercher du "pain"! Je t'aime!

Dame Popi, ma tendre et rigolote belle-sœur, tu es un ange! Tu es toujours à mes côtés depuis plus de 10 ans, tu me fais rire, tu m'écoutes et me conseilles sur le banc des *ranwouennes*! Tout comme ton cher conjoint (ma pauvre... drôle de choix...), je serais bien malheureuse sans ta présence à mes côtés à Rennes! Je t'aime !

Et merci aux autres membres de la famille (belle famille pour le coup!): Raphou, Matt, Jean-Claude (!), Pochiane, Sylvie et Frédéric! Merci à vous tous d'avoir été toujours présent!

Ah, maintenant c'est au tour du plus beau! Le gibbon de gibbonie, mon neveu chéri, l'enfant roi! Mon petit Eliott, tu es né 6 mois après mon début de thèse et tu m'as rendu tellement heureuse! "tata ramine,

pourquoi tu es en pyjama”...qu’il est bon d’avoir enfin un membre de la famille extrêmement lucide (ou simplement honnête!) quant à mon style vestimentaire! Je t’aime mon petit gibbon, tu me fais rire et tes câlins sont un bonheur! (*même si maintenant, tu es le préféré de Nono et qu’on passe tout le temps après toi!*)

Et puis, pour finir par la personne qui m’épaule le plus au quotidien et qui fait de mes journées un bonheur au sein d’un cocon douillet. Charly, mon ppc depuis presque 3 ans... tu as pris la relève de Lucie avec brillo dans la “colloc” (à coup d’avenants au contrat de quelques mois, renouvelables indéfiniment)! Tu m’as tellement soutenu pendant ces 3 ans de thèse... Merci... merci d’être là mon saltimbanque, de veiller sur moi! Avec toi, j’ai découvert que la vie de couple pouvait être simple et saine, que j’avais le droit de faiblir, de craquer, d’être fragile. Tu as su m’écouter, ne pas me brusquer, toujours avec les mots justes (ou presque!) même si nos deux caractères sont aux antipodes. Quelle patience aussi de m’entendre ranwouenner sur le potelage et les “couicouisse” pour enchaîner sur une bière et des “cawouete”!! merci Charly, “586” (pudique)... A nous la vraie vie maintenant! Tournée des campings municipaux (*tiens...tiens...*) et des PMU de campagne <3 .



## Sommaire

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>18</b>
<b>Histoire de la viticulture bordelaise et présentation de la région viticole</b>	<b>20</b>
Bref historique des vignobles bordelais	20
Le Médoc : terroir, climat, cépage et transition durable	20
<b>Contexte général de la thèse</b>	<b>22</b>
Contexte scientifique	22
Structure de la thèse	25
<b>Revue de la bibliographie</b>	<b>26</b>
Le microbiote des plantes	26
Généralités, colonisation et niches microbiennes	26
Généralités	26
Colonisation de la plante	27
Les racines : haut lieu d'interactions plante - microorganismes	29
Fonctions des microorganismes pour les plantes	30
Généralités	30
Nutrition hydrique et minérale	31
Résistance aux stress abiotiques	32
Résistance aux stress biotiques	33
Croissance et fitness	34
Théorie de l'holobionte : Nous ne sommes pas seuls Mulder!	35
Généralités et émergence des concepts	35
Transmission du microbiote	38
Holobionte et phénotypes	39
Controverses et nécessité de preuves expérimentales	40
<i>Le terroir microbiologique</i> de la vigne : Et si l'infiniment petit participait à la grandeur des vins	42
Beauté et complexité du terroir	42
<i>Le terroir microbiologique</i>	43
Généralités	43
Biogéographie des microorganismes et règles d'assemblages	43
	10

Assemblages microbiens et principaux facteurs	45
Paramètres du sol	46
Climat et temporalité	47
Échelle spatiale considérée	48
Autres facteurs : pratiques viticoles	49
Travail du sol	49
Intrants	50
Sélection variétale	51
Objectifs de la thèse	52
<b>CHAPITRE 1 - ÉLÉMENT DE MÉTHODOLOGIE</b>	<b>54</b>
Site d'étude et modèle biologique	56
Château Palmer : historique, domaine, pratiques viticoles et engagement	56
La vigne	58
Greffage et plantes chimériques	59
Caractérisation du <i>terroir microbiologique</i> de la vigne	62
Conditionnement des racines et biologie moléculaire	63
Analyses bioinformatiques	65
<b>CHAPITRE 2 - LA VIGNE COMME HOLOBIONTE</b>	<b>70</b>
Évaluation du concept d'holobionte par l'analyse du microbiote endosphérique de plantes chimériques	70
<b>CHAPITRE 3 - VIGNE &amp; ASSEMBLAGES MICROBIENS</b>	<b>108</b>
Dynamique temporelle et déterminants environnementaux du microbiote endosphérique racinaire à l'échelle d'un domaine viticole	108
<b>CHAPITRE 3.1 - FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET LIÉS À LA VIGNE</b>	<b>110</b>
Les facteurs qui déterminent la composition de l'endosphère racinaire du microbiote de la vigne sont à la fois abiotiques et spécifiques à la plante.	110
<b>CHAPITRE 3.2 - DYNAMIQUE TEMPORELLE</b>	<b>138</b>
La variabilité intra- et inter-annuelle des communautés microbiennes de l'endosphère racinaire de <i>Vitis vinifera</i> est principalement déterministe.	138
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE</b>	<b>184</b>
Plantes chimériques, légitimité du concept d'holobionte et preuves empiriques	187
Déterminisme et validité de l'holobionte	187
Déterminants des communautés microbiennes des plantes chimériques	187
Facteurs déterminant la variabilité spatio-temporelle des assemblages microbiens	189
	11

Facteurs environnementaux, pratiques viticoles, spécificités de la plante	189
Facteurs environnementaux	189
Facteurs inhérents à la plante	190
Complexité du <i>terroir microbiologique</i> et pratiques	191
Variabilité temporelle	193
Dynamique temporelle intra- et inter-annuelle	193
Changements au cours de la vie de la vigne	195
Définir le <i>terroir microbiologique</i> et sa mobilisation pour la gestion de la vigne	196
Mieux décrire le <i>terroir microbiologique</i>	197
Améliorer les connaissances : combiner conditions contrôlées et suivis en plein champ	198
Lien avec les performances de la vigne	199
Le <i>terroir microbiologique</i> pour la gestion de la vigne	200
Gérer la vigne comme un holobionte	200
Des nouveaux outils pour le diagnostic du <i>terroir microbiologique</i> et les actions de gestion	202
Le <i>terroir microbiologique</i> face aux changements globaux	203
Pour conclure ...	206
<b>RÉFÉRENCE BIBLIO</b>	<b>208</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>224</b>
Article additionnel	224
Tableau 1 : Informations complémentaires sur les parcelles échantillonnées	225



## AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée au sein de l'UMR CNRS 6553 ECOBIO (“Écosystèmes, Biodiversité, Évolution”) de l'Université de Rennes 1 (Rennes) grâce à la mise en place d'un partenariat CIFRE (ANRT) entre cette unité et différents acteurs du secteur privé. Cette thèse est également rattachée à l'unité BAGAP (“Biodiversité, Agroécologie et Aménagement du Paysage”) de l'INRAE Centre Bretagne-Normandie.

Les acteurs privés impliqués dans ce projet et le finançant sont :

-Château Palmer (33, Margaux, France) : domaine viticole à l'initiative de cette thèse CIFRE et principal site d'échantillonnage.

-Sovivins (33, Martillac, France) : société d'expertise et de conseil spécialisée dans le domaine de la viticulture (de l'analyse du sol au produit fini). Expert viticole travaillant en étroite relation avec Château Palmer.

-Pépinière De Salettes (64, Denguin, France) : pépinière viticole en relation avec Château Palmer et site d'échantillonnage pour une des parties de cette thèse.

-Château Latour (33, Pauillac, France) : domaine viticole ayant rejoint ce projet de thèse durant la deuxième année et site secondaire d'échantillonnage pour une partie de cette thèse.





La thèse est articulée autour de trois grands axes d'étude définis à l'écriture de ce sujet de thèse :

1- Le premier axe de cette thèse cherche à mieux définir la théorie de l'holobionte en testant expérimentalement sa véracité via l'analyse de plantes chimériques et à analyser l'impact du greffage sur le microbiote endosphérique racinaire des plantes,

2- Le second axe s'intéresse au *terroir microbiologique* de la vigne à petite échelle spatiale au sein d'un domaine viticole et aux facteurs pouvant modifier et impacter la structure des communautés microbiennes,

3- Le troisième axe s'intéresse aux pratiques de viticulture et son impact sur le microbiote des plantes.

Durant cette thèse, plusieurs expériences que l'on pourrait qualifier de "pilotes" ont été mises en place, et ce, en plus des expériences "majeures" faisant l'objet de publications scientifiques. L'ensemble de ces expériences structure l'axe 3 de cette thèse (impact des pratiques). Ces expériences dites "pilotes", bien que leurs intérêts scientifiques soient non négligeables, ne seront pas présentées dans ce manuscrit. Ce choix est motivé par un souci de cohérence dans le déroulé de ce manuscrit. Cependant, ces expériences ont fait l'objet de livrables sous forme de "rapports d'analyses" et leurs résultats ont été partagés avec les partenaires privés du projet. Ces rapports peuvent être consultables sur demande.

La majeure partie du terrain de thèse et des échantillonnages s'est déroulée au sein du vignoble de Château Palmer (axe 2) et en collaboration avec la pépinière de Salettes (axe 1).

Ainsi, l'axe 1 de cette thèse, qui s'intéresse à l'impact du greffage sur le microbiote de la vigne dans un cadre conceptuel de théorie de l'holobionte, a été menée en étroite collaboration avec la pépinière viticole de Salettes et plantée sur des terres annexes de la pépinière à Saint-Geours-de-Maremne (40). L'axe 1 de cette thèse a été réalisé en collaboration avec une équipe de Nanjing Agricultural University (Chine) et a été en partie financé par le programme EC2CO HOLOBIONT (CNRS-2020).

Pour l'axe 2, qui cherche à mieux définir le *terroir microbiologique* de la vigne, un vaste plan d'échantillonnage a été mis en place en collaboration avec Château Palmer et s'étend sur l'ensemble de ce domaine.

Pour le troisième axe de cette thèse, différentes expériences pilotes ont été menées sur deux domaines viticoles principalement.

Afin d'analyser l'effet des pratiques de gestion en viticulture biologique et biodynamique, trois expériences pilotes ont été mises en place aux Château Palmer et Château Latour. L'expérience 1, visant à comparer l'effet de la pratique biologique et biodynamique et la pulvérisation de solutions de biodynamie *in situ* sur le microbiote de la vigne, a été menée sur une parcelle du domaine de Château Latour. L'expérience 2, visant à étayer les connaissances sur la composition microbienne des solutions

de biodynamie, a été réalisée grâce à l'analyse des solutions biodynamiques récoltées aux domaines des Châteaux Palmer et Latour, et ce, à différents stades de maturité de ces solutions. L'expérience 3, visant à tester l'impact de différents types d'enherbement sur le mycobiote de la vigne, a été menée sur une parcelle du domaine de Château Palmer.

Une quatrième expérience pilote a été mise en place en collaboration avec la pépinière de Salettes, afin d'analyser l'effet des pratiques de gestion au sein de la pépinière viticole. Ainsi, l'expérience pilote 4 a permis d'analyser l'impact du traitement à l'eau chaude des greffons et l'origine du greffon sur le microbiote de la vigne.

D'ores et déjà, ce projet a fait l'objet de différentes publications scientifiques écrites ou orales au cours des 3 années de thèse :

### Articles scientifiques

-**Biget M.**, Mony C., Aubry M., Jambon O., Quaiser A., Chable V., Pernet S., Vandenkoornhuysse P. (2021) The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors. *OENO One*; **3**:299-315.

-**Biget M.**, Mony C., Jambon O., Causse-Védrine R., Michon-Coudouel S., Hervé M., Chable V., Vandenkoornhuysse P. Intra and inter-annual changes in root endospheric microbial communities of *Vitis vinifera* are mainly deterministic. *soumis à mSystems*.

-**Biget M.\***, Wang T.\*, Mony C., Xu Q., Lecoq L., Chable V., Theis K., Bordenstein S., Ling N., Vandenkoornhuysse P. Evaluating the holobiont concept by the analysis of the endospheric microbiota of chimeric plants. *In prep. (soumission prévue à PNAS)*

-**Biget M.\***, Miteul A.\*, Mataigne V., Chable V., Pernet S., Vandenkoornhuysse P., Mony C. Age-dependency of microbiota: example of the grapevine. *In prep.*

De plus, j'ai eu l'opportunité d'être intégrée à d'autres projets parallèles, dont un projet sur le microbiote du blé. Pour ce projet, j'ai pu être associée aux auteurs de l'article (article accepté). Ma participation dans cet article repose essentiellement sur mes compétences en biologie moléculaire et expertise en séquençage et génomique environnementale. Les détails de cet article (titre, auteurs) sont exposés en annexes de ce manuscrit.

### Présentations orales

-**Biget, M.**, Mony, C., Aubry, M., Jambon O., Quaiser, A., Pernet, S., Chable, V., Vandenkoornhuysse, P. "Microbial Terroir of a vineyard": The environmental drivers and assemblages of microorganisms at local scale. *IXe Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM2019)*, Novembre 2019, Bussang, France (Poster pitch en présentiel).

**-Biget, M.,** Mony, C., Aubry, M., Jambon O., Quaiser, A., Pernet, S., Chable, V., Vandenkoornhuyse, P. The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors. *EUCARPIA 2021 International conference - “Breeding and seed sector innovations for organic food systems”*, Mars 2021, Lettonie (Présentation orale en distanciel).

**-Biget, M.,** Mony, C., Aubry, M., Jambon O., Quaiser, A., Pernet, S., Chable, V., Vandenkoornhuyse, P. The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors. *Journées Scientifiques (EGAAL 2021)*, Juillet 2021, Rennes, France (Poster pitch en distanciel)

**-Biget, M.,** Mony, C., Aubry, M., Jambon O., Quaiser, A., Pernet, S., Chable, V., Vandenkoornhuyse, P. “*Microbial Terroir* of a vineyard”: The environmental drivers and assemblages of microorganisms at local scale. *International conference - Organic World Congress 2021 (OWC2021)*, Septembre 2021, Rennes, France (Poster pitch en distanciel)

**-Biget, M.,** Mony, C., Jambon O., Causse-Védrine R., Michon-Coudouel S., Hervé M., Chable, V., Vandenkoornhuyse, P. Intra-annual shift and deterministic assembly of root endospheric microbial communities of the grapevines. *Environmental and Agronomical Genomics Symposium 2021 (GDR-GE 2021)*, Octobre 2021, Tours, France – (Présentation orale acceptée)



**INTRODUCTION  
GÉNÉRALE**



## A. Histoire de la viticulture bordelaise et présentation de la région viticole

### I. Bref historique des vignobles bordelais

Les vignobles bordelais trouvent leur origine au 1<sup>er</sup> siècle de notre ère avec la plantation des premières vignes dans cette région. Il faut attendre le 12<sup>ème</sup> siècle pour qu'ils connaissent une forte expansion, grâce notamment, au commerce avec l'Angleterre sous l'impulsion du futur roi d'Angleterre et de son union avec Aliénor d'Aquitaine. Au 17<sup>ème</sup> siècle, les vignobles Bordelais connaissent un nouvel essor sous l'influence des grands commerçants et acheteurs Hollandais. Ces derniers, appréciant particulièrement les vins blancs et vins de palus vinifiés en rouge, orientent les productions viticoles de la région Bordelaise selon leurs préférences et intérêts commerciaux. Au 18<sup>ème</sup> siècle, en pleine époque coloniale, l'export des vins de Bordeaux en tonneau est grandissant. À la même époque, l'Angleterre promeut les vins fins et de garde, de caractère corsé, représentant le standing et les préférences gustatives de la haute société Londonienne. Ce tournant Anglais initiera les débuts de la production de bouteilles de vin bouchées au détriment des tonneaux.

Lors de l'Exposition Universelle de Paris en 1855, un classement des vins de Gironde sera demandé à la chambre de commerce de Bordeaux et au syndicat des courtiers par Napoléon III. Dans ce classement, la notoriété des crus et le prix des transactions permettent de classer seulement 60 grands châteaux, dont 59 dans le Médoc, comme "grands crus classés". Ce classement, toujours en vigueur de nos jours, permettra d'asseoir le prestige que l'on connaît actuellement des vins de Bordeaux et de développer l'export vers les pays membres de l'Europe.

De nos jours, les vins de Bordeaux représentent la plus grande superficie viticole de vins AOC (appellation d'origine contrôlée) de France avec 111 500 hectares de vignes équivalant à 25 % des superficies de vins AOC de France ; les grands crus classés représentant seulement 5 % de cette superficie. Le Médoc, région viticole dans laquelle se déroule cette thèse, représente 15 % du vignoble bordelais et comprend 6 appellations communales, dont Margaux où se situe le Château Palmer.

### II. Le Médoc : terroir, climat, cépage et transition durable

Le Médoc, traversé par le 45<sup>ème</sup> parallèle, est caractérisé par un climat océanique tempéré, présentant de faibles variations de température et une pluviométrie relativement homogène au cours de l'année (925 mm de cumul en moyenne) ce qui confère à la région des conditions de viticulture favorables. Sa proximité avec la forêt des Landes tempère l'influence de l'Océan Atlantique et la présence de l'estuaire de la Gironde au Nord permet la régulation thermique de la région et modère les écarts de températures. Si en moyenne, les variations de température et de pluie sont relativement faibles, cette région est cependant soumise à des épisodes climatiques extrêmes et ponctuels tels que des gelées,

## Introduction générale

des orages associés à de fortes précipitations de grêle, phénomènes qui s'intensifient depuis plusieurs années.

A ce climat particulier s'ajoute une géologie toute aussi exceptionnelle, s'étant modelée au fur et à mesure des événements géologiques et des périodes de glaciation. Les terres sont principalement composées de terrasses alluviales à étages résultant de l'accumulation successive de dépôts de la Gironde durant le quaternaire. Ces terrasses se distinguent par des affleurements de graves (dépôts de graviers et de galets arrachés au relief pyrénéen il y a des millions d'années) dont l'importance varie selon le *terroir* au sein même du Médoc. Les premières couches sont donc des horizons sablo-graveleux qui recouvrent des couches plus profondes principalement argilo-calcaires. Les sols sont généralement très drainants et perméables. La particularité de l'horizon sablo-graveleux est sa capacité à accumuler la chaleur du jour (assurée par les graves) et de la restituer durant la nuit. La couche argileuse, que l'on retrouve en profondeur (80-150 cm), permet une bonne régulation de l'eau dans les sols et joue sur la contrainte hydrique à laquelle la vigne doit faire face.

Enfin, les cépages plantés et utilisés différemment dans les assemblages des vins participent largement à la spécificité d'un *terroir*. Ainsi, les vins du Médoc sont caractérisés par l'utilisation de différents cépages : Le Cabernet-Sauvignon, le Merlot, le Petit Verdot, le Malbec pour ne citer que les principaux. Le Cabernet-Sauvignon et le Merlot sont les deux cépages les plus plantés dans le Médoc et constituent les cépages majoritaires des assemblages des vins du Médoc. Le Petit Verdot peut être ajouté à moins de 5 % dans les assemblages selon les domaines et les millésimes. Le Merlot est plus précoce que le Cabernet-Sauvignon dans sa maturation. Généralement, le Cabernet-Sauvignon est planté dans les sols de graves et drainés alors que le Merlot sera préférentiellement planté dans les sols argileux qui se réchauffent plus tardivement. Par ailleurs, le cépage Merlot est plus sensible aux attaques de mildiou par rapport au Cabernet-Sauvignon et au Petit Verdot, particularité bien connue des vignerons.

Depuis quelques années, on observe de plus en plus de domaines viticoles de la région se tourner vers des pratiques plus durables. Dans le cas de Château Palmer, le site d'étude principal de cette thèse, de nombreux exemples de recherches et expérimentations (voir Chapitre 1 "Eléments de méthodologie", Partie A) permettent facilement de comprendre que la philosophie de ce château va bien au-delà de la viticulture stricte et même de la pratique en biologie et biodynamie. Ce domaine cherche réellement à recréer des écosystèmes naturels et agricoles, bien souvent détruits à cause de l'intensification de l'agriculture. Ce changement de pratiques à Château Palmer et dans d'autres domaines viticoles fait écho à une prise de conscience plus générale quant à l'importance de préserver des écosystèmes pour parvenir à produire durablement. La volonté de comprendre plus finement les mécanismes écologiques associés à la vigne, et en particulier les relations plante-microorganismes, mais également de comprendre l'impact de leurs pratiques sur ce compartiment microbien, a conduit Château Palmer, associé aux autres partenaires privés, à accompagner la réalisation de cette thèse de doctorat spécialisée en écologie microbienne.

## B. Contexte général de la thèse

### I. Contexte scientifique

Cette thèse d'écologie s'inscrit dans un contexte général d'étude des écosystèmes et de l'impact des pratiques humaines. Elle est aussi le fruit d'une prise de conscience des particuliers et des acteurs du monde agricole/viticole, des enjeux écologiques majeurs actuels et futurs auxquels nous devons faire face (Mazzocchi, Ruggeri & Corsi 2019; Trivedi *et al.* 2021). L'intensification de la production agricole a permis pendant un temps de répondre aux besoins d'une population mondiale de plus en plus grandissante sans se soucier de la destruction des écosystèmes. L'augmentation de cette production agricole, si le modèle de production actuel reste inchangé, va nécessiter la transformation de nombreux écosystèmes naturels en champs agricoles, entraînant une extinction massive de la biodiversité naturelle (p.ex. Altieri & Nicholls 2002). Un enjeu majeur de l'agriculture moderne et de l'écologie est donc de pallier les besoins d'une population en continuelle croissance tout en prenant soin des terres, des environnements, des personnes afin de supporter le (re-) développement d'une agriculture durable plus respectueuse. Cet enjeu ne peut être atteint sans le travail conjoint des scientifiques, des politiques mais surtout, des acteurs de terrain en promouvant l'importance de la recherche participative (Chable & Serpolay 2016). Outre la production pour la consommation humaine, l'intensification des pratiques est également vraie au sein des cultures à forte valeur ajoutée telle que la viticulture.

L'intérêt économique et biologique de la vigne est grand. Selon l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), la production mondiale de vin a atteint 292 millions d'hectolitres en 2018 représentant une valeur brute 31.4 milliards d'euros (OIV 2019). La vigne représente donc un commerce très important dans le monde, poussant ainsi les autorités et les scientifiques à devancer les problèmes liés aux changements globaux et comprendre l'origine de nombreuses maladies propres à la vigne. Depuis plus d'un siècle, la production viticole s'est fortement intensifiée et repose sur les principes industriels de production agricole. Les vignes sont cultivées en monoculture, la densité des pieds à l'hectare est forte et l'utilisation de produits phytosanitaires, en pratique dite "conventionnelle" permet de pallier, à court terme, les problèmes de maladies. L'ensemble de ces pratiques conduit inexorablement à la destruction des agro-écosystèmes (Benton, Vickery & Wilson 2003; Foley 2005; Power 2010). De plus, afin de remédier aux attaques du phylloxéra de la vigne (*Daktulosphaira vitifoliae*) qui a décimé les vignobles européens au XIX<sup>ème</sup> siècle, le greffage de la vigne, entre un porte-greffe américain résistant et un clone de greffons européens, est devenu systématique (Banerjee *et al.* 2010; Forneck *et al.* 2002). Il en résulte une perte de diversité génétique, d'une part des porte-greffes, mais également des greffons, cultivés de façon clonale (Ramos, Ribeiro & Figueiredo 2019; Bettenfeld *et al.* 2020).

Depuis plusieurs décennies, on observe les limites de l'agriculture dite "conventionnelle" (p.ex. résistance de certains pathogènes, dépérissement des cultures) et une diminution de cette pratique au profit de pratiques alternatives telles que la pratique biologique, biodynamique ou encore la permaculture



## Introduction générale

(Caplat 2012, 2014). Le but général de cette transition est de réduire l'impact des pratiques agricoles sur le fonctionnement écologique des agro-écosystèmes (Tamburini *et al.* 2020). Ces pratiques plus raisonnées tendent à réintroduire de la diversité au sein des agrosystèmes (utilisation de cultures mixtes ou d'adventices chez le blé ou enherbement des inter-rang chez la vigne par exemple), de bannir l'utilisation de produits chimiques et phytosanitaires délétères pour la microfaune du sol ou encore de diminuer le travail mécanique intensif du sol dans le cas de la mise en place de couverts végétaux. La pratique en biodynamie repose quant à elle sur un socle commun aux pratiques biologiques additionnées de certaines particularités qui lui sont propres : prise en compte des cycles lunaires, solaires et planétaires et utilisation de préparations fermentées utilisées en compost ou sous forme de pulvérisation sur le sol ou les feuilles (solution 500 et 501) (Florin 2018; Foyer 2018). La viticulture en biodynamie fait d'ailleurs l'objet d'un intérêt croissant en France puisque plus de 400 domaines viticoles étaient certifiés en biodynamie en 2015 (Foyer 2018) dont de grands domaines viticoles. La vision générale des bienfaits de ces pratiques alternatives a été pendant longtemps centrée sur la santé du sol, des plantes et de la macrofaune. Cependant, depuis plusieurs années, un regard nouveau est porté sur les microorganismes, leur importance dans les écosystèmes et l'impact des pratiques sur ce microbiote (Banerjee *et al.* 2019). En effet, l'ensemble des pratiques précédemment citées est étroitement lié à l'augmentation et à la diversification des microorganismes dans les écosystèmes (Duhamel & Vandenkoornhuys 2013; Trivedi *et al.* 2021). Même si l'importance des microorganismes dans les écosystèmes est de plus en plus acceptée, l'écologie microbienne reste un champ récent d'investigations scientifiques encore largement exploratoire, notamment dans les agro-écosystèmes.

La montée en puissance de l'intérêt des microorganismes dans la recherche scientifique, mais également dans l'opinion publique, est apparue avec les études sur la santé humaine et le rôle de ces microorganismes dans les maladies et désordres cliniques (Human Microbiome Project Turnbaugh *et al.* 2007). En parallèle, l'amélioration des technologies de séquençage a permis de décrire plus finement la composition des microorganismes associés aux différents hôtes. Dans la nature et pour les plantes, l'importance des microorganismes est d'autant plus vraie car contrairement aux macro-organismes, les plantes ne peuvent pas se mouvoir afin d'échapper à des stress abiotiques ou biotiques (Müller *et al.* 2016; Compant *et al.* 2019). L'ensemble des plantes terrestres est colonisé par une grande diversité de microorganismes que ce soit à l'extérieur ou à l'intérieur des tissus et qui constitue ce que l'on appelle le microbiote (Müller *et al.* 2016). La colonisation des plantes par les microorganismes se fait essentiellement du sol à la racine (Vandenkoornhuys *et al.* 2015), mais également dans une moindre mesure, via la colonisation des parties aériennes des microorganismes présents dans l'atmosphère (Lindow & Brandl 2003). De plus, certains microorganismes endophytes des racines peuvent se déplacer via le système vasculaire et de ce fait, coloniser d'autres organes végétaux (Compant, Clément & Sessitsch 2010; Deyett & Rolshausen 2019; Xiong *et al.* 2021). Le microbiote assure des fonctions écologiques majeures pour la plante telles que la nutrition minérale et hydrique affectant la santé de la plante, sa croissance et sa survie (*fitness*), et permet également de tamponner l'effet des variations

## Introduction générale

climatiques ou de lutter contre des pathogènes (Compant *et al.* 2019; Trivedi *et al.* 2020). Ce microbiote est sous l'influence de nombreux paramètres environnementaux (p.ex. paramètres physico-chimiques du sol, climat) et varie dans l'espace et le temps (Ladau & Eloe-Fadrosh 2019). Du fait de la complexité d'analyse des interactions entre plantes-microorganismes, de la variabilité selon l'échelle spatiale et/ou temporelle considérée, beaucoup de connaissances sur les règles d'assemblage des communautés microbiennes restent encore à découvrir.

De nombreuses évidences démontrant l'ubiquité des microorganismes, leur importance dans la survie et dans l'adaptabilité des plantes (et autres macro-organismes) ainsi leur impact sur le phénotype, ont permis de proposer une nouvelle vision des interactions plantes-microorganismes. Ainsi, une plante (et tout autre macro-organisme) ne devrait plus être considérée comme un seul individu indépendant, mais plutôt comme la résultante d'interactions complexes entre cet hôte et son cortège microbien. C'est à partir de ces observations et de ce postulat qu'a été proposé le concept d'holobionte (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008). Ce concept permet une vision plus globale de ce qu'est le vivant et place donc les microorganismes au centre des écosystèmes (Bordenstein & Theis 2015; Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2021). Associée à ce concept d'holobionte, la théorie de l'hologénome a également été proposée et peut être définie de façon simplifiée comme la somme des gènes d'un hôte et de son microbiote (Bordenstein & Theis 2015). Cette addition de gènes microbiens n'est pas anecdotique et permet d'augmenter considérablement les fonctions de l'hôte. Par exemple, il a été montré récemment que le microbiote de l'intestin humain possède environ 1000 fois plus de gènes bactériens qu'humains (22 millions de gènes bactériens non redondants) (Tierney *et al.* 2019). Cependant, même si le développement de ces concepts paraît raisonnable, leur légitimité et leur valeur ont été débattues et remises en question du fait d'une mauvaise interprétation/compréhension mais aussi par le manque de preuves expérimentales de leurs existences (Theis *et al.* 2016). Il existe donc un besoin urgent de tester empiriquement la légitimité de ces concepts et les questions inhérentes à l'héritabilité du microbiote afin de considérer une plante et son cortège de microorganismes comme une seule entité fonctionnelle. Le fait de considérer les plantes, et la vigne dans notre cas d'étude, comme des holobiontes a permis l'émergence du concept de *terroir microbiologique* de la vigne mettant en avant l'importance de la couche microscopique que sont les microorganismes dans la définition fine de ce qu'est le *terroir*.

Le concept de *terroir microbiologique* de la vigne est un concept récent proposé par Gayevskiy & Goddard (2012) (travaux sur les levures *S. cerevisiae*) et étendu, par Bokulich et ses collègues (2014) il y a moins de 10 ans, aux bactéries et champignons, afin de démontrer l'existence d'assemblages régionaux des communautés microbiennes (Gayevskiy & Goddard 2012; Bokulich *et al.* 2014). L'énoncé de ce concept fait écho à l'ensemble des idées détaillées ci-dessus, et particulièrement à l'importance des microorganismes dans la spécificité des vins. Ainsi, l'analyse des microorganismes associés à la vigne permet de définir plus finement ce qu'est le *terroir* d'un vignoble ou d'une région viticole (Gilbert, van der Lelie & Zorraonaindia 2014). En effet, le caractère, les propriétés organoleptiques et la qualité d'un

## Introduction générale

vin sont généralement associés au *terroir* de la vigne, c'est-à-dire, à l'ensemble des caractéristiques pédologiques, topologiques et climatiques ainsi que les pratiques viticoles d'un vignoble ou d'une région (Van Leeuwen & Seguin 2006), ces paramètres étant bien décrits comme des facteurs importants du développement des plantes. Cependant, grâce aux progrès de la compréhension des interactions entre les plantes et les microorganismes, cette vision exclusive du *terroir* est aujourd'hui remise en question, ou du moins, revisitée. Ainsi, de nombreuses évidences ont montré l'importance des microorganismes sur le produit fini (p.ex. Bokulich *et al.* 2014; Burns *et al.* 2015; Knight *et al.* 2015; Belda *et al.* 2017; Morrison-Whittle & Goddard 2018), renforçant l'importance de ce *terroir microbiologique* pour une meilleure appréhension de la plante et des pratiques. Ce *terroir microbiologique* de la vigne est sous l'influence d'un grand nombre de facteurs. En fonction des conditions locales, telle que l'hétérogénéité spatiale (p.ex. Bokulich *et al.* 2014; Burns *et al.* 2015; Miura *et al.* 2017; Mezzasalma *et al.* 2018), des pratiques humaines (p.ex. gestion de la vigne, enherbement, irrigation, lutte phyto-sanitaire) (p.ex. Pinto *et al.* 2014; Burns *et al.* 2016; Chou *et al.* 2018), mais également des cépages et génotypes utilisés (p.ex. Marasco *et al.* 2018; Berlanas *et al.* 2019; Vink *et al.* 2021) ou encore de la dynamique temporelle intra- et inter-annuelle (Berlanas *et al.* 2019; Liu & Howell 2020; Vink *et al.* 2021), l'assemblage, la richesse et la diversité des microorganismes associés aux plants de vigne varient (pour une revue de la littérature, se référer à Liu *et al.* 2019). Par conséquent, la compréhension des modèles d'assemblage des communautés microbiennes et des facteurs pouvant affecter cette structuration et donc les fonctions écologiques associées à la vigne, reste un sujet majeur de recherche. Les études portant sur le *terroir microbiologique* de la vigne doivent, *in fine*, permettre une adaptation des pratiques viticoles afin de favoriser la diversité microbienne et donc d'intensifier la spécificité et la qualité du vin.

## II. Structure de la thèse

Cette thèse cherche à étayer les connaissances sur les différents concepts détaillés dans le contexte général. Ainsi, durant ces trois ans, j'ai travaillé autour d'hypothèses (H) liées à des notions clés d'écologie, de sciences végétales et d'écologie microbienne grâce à la mise en place de plusieurs plans d'expériences (Chapitre 1). Dans un premier temps, autour de la question de la réalité biologique du concept d'holobionte, j'ai testé, via la production et l'analyse de plantes chimériques greffées, l'hypothèse du (H1) recrutement actif de microorganismes acquis horizontalement et de l'aspect déterministe ou stochastique des assemblages microbiens de telles plantes chimériques (Chapitre 2). Ensuite, autour de la question du *terroir microbiologique* de la vigne (Chapitre 3), j'ai cherché à mettre en évidence les facteurs clés pouvant impacter les assemblages microbiens de l'hôte (dans le cas de cette thèse: la vigne) en testant les hypothèses de variabilité du microbiote bactérien et fongique à petite échelle spatiale (un domaine viticole) (H2) en fonction des facteurs environnementaux et spécifiques à la vigne (Chapitre 3.1) ainsi que (H3) en fonction de la dynamique temporelle (intra- et inter-annuelle) (Chapitre 3.2). Par ailleurs, comme expliqué dans l'avant-propos de cette thèse, l'impact des pratiques a

fait l'objet d'expériences "pilotes" et de rapports d'analyses transmis aux partenaires mais ne font pas partie de ce manuscrit de thèse.

## C. Revue de la bibliographie

### I. Le microbiote des plantes

#### a. Généralités, colonisation et niches microbiennes

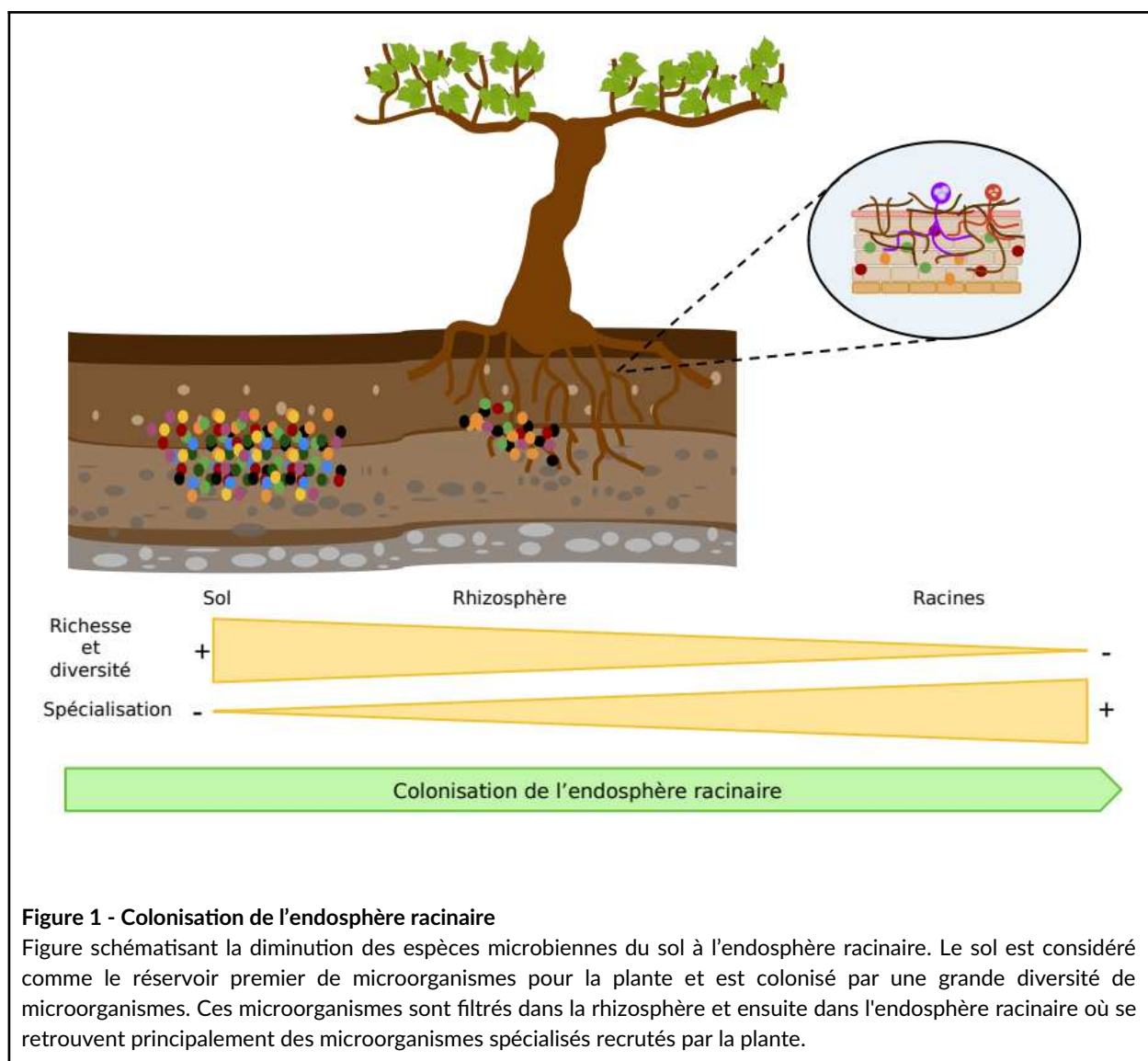
##### i. Généralités

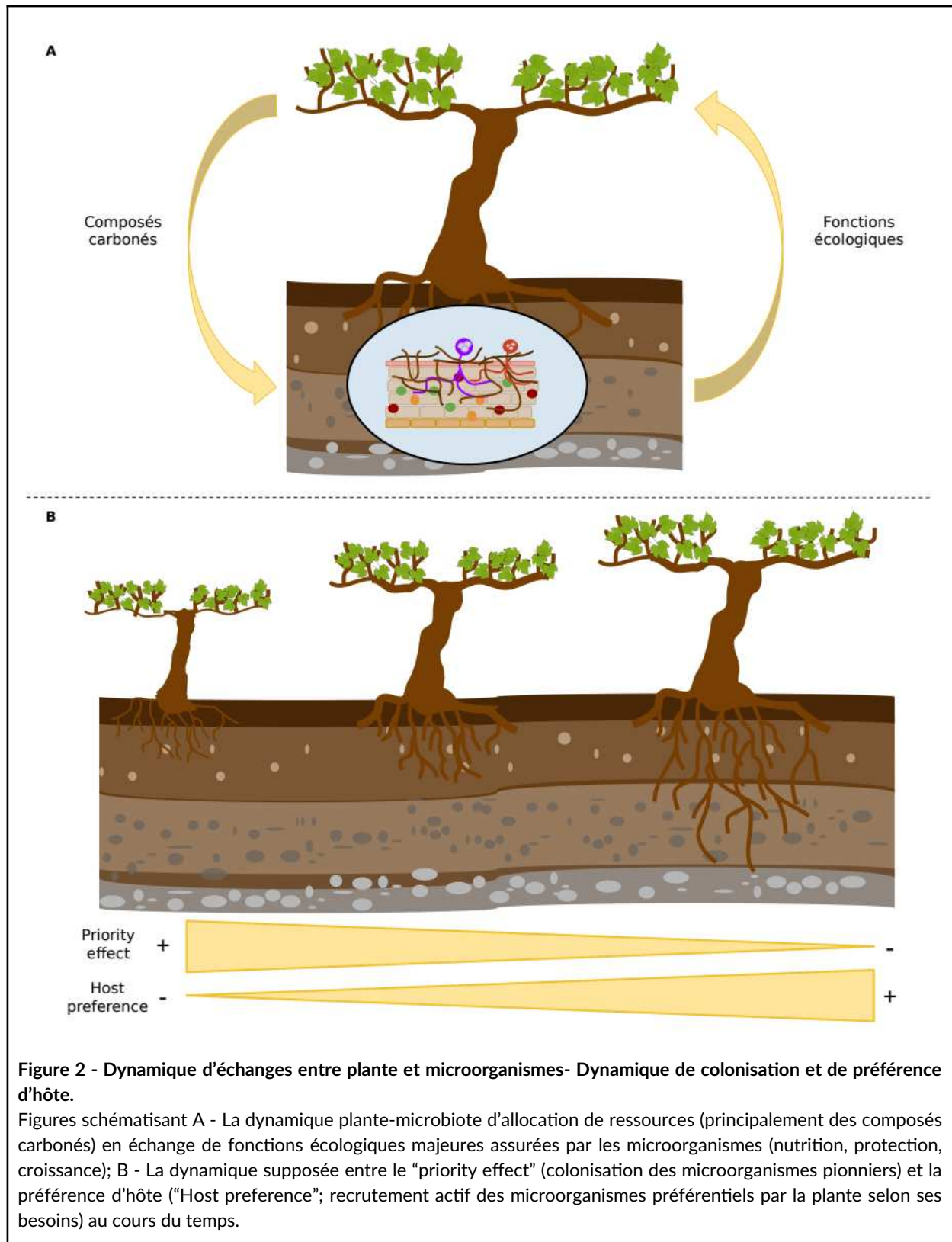
Les plantes sont intimement liées aux microorganismes avec lesquels elles interagissent et modèlent ce que l'on appelle leur microbiote. Ces interactions ne sont en aucun cas uni-directionnelles puisque les microorganismes, à leur tour, peuvent moduler le microbiote de leur hôte. Le terme "microbiome" (l'équivalent de "microbiote") a été utilisé pour la première fois par Joshua Lederberg pour définir la "communauté écologique de microorganismes commensaux, symbiotes ou pathogènes, qui occupe littéralement l'espace de notre corps" (Lederberg 2001). Ce terme, à l'origine anthropocentré, s'avère tout à fait applicable à l'ensemble des êtres vivants et a d'ailleurs été étendu aux microorganismes vivants dans des hôtes spécifiques ou des habitats donnés (Boon *et al.* 2014; Ofek *et al.* 2014). En effet, l'ensemble des organismes multicellulaires, comme les plantes et les animaux, est associé à différents microorganismes (bactéries, champignons, archées) et ce, à des degrés variables d'interaction (Morris 2018). Aucune exception n'est à ce jour connue dans le monde vivant (Morris 2018).

L'ensemble des organes d'une plante peut être colonisé par les microorganismes (racines, tiges, vaisseaux, graines, fruits, feuilles) (Compant *et al.* 2019). Il est communément admis que la colonisation des plantes par les microorganismes se fait du sol vers l'endosphère racinaire ou par la voie aérienne (phyllosphère) (Müller *et al.* 2016). Au niveau de la partie racinaire, le microbiote des plantes peut ainsi être classé en différents groupes faisant écho aux différents habitats : le sol (microorganismes vivant à proximité des plantes mais sans contact "direct" avec ces dernières), la rhizosphère (microorganismes vivant dans le sol, autour des racines des plantes), la rhizoplane (microorganismes vivant à la surface des racines) et l'endosphère racinaire (microorganismes endophytes, vivant à l'intérieur des racines) (Tkacz *et al.* 2020). Cette classification peut également être appliquée à la partie aérienne des plantes (phyllosphère) puisqu'il existe des microorganismes dans l'atmosphère, à proximité des feuilles, sur les feuilles (épiphytes) et colonisant l'intérieur des feuilles (endophytes) (Pandiyan *et al.* 2021). De plus, les fruits (baies) possèdent également un microbiote épiphyte et endophyte (Compant *et al.* 2011; Hardoim *et al.* 2015). Ce microbiote peut provenir de l'environnement extérieur mais également via le transfert par les vaisseaux de la plante (Compant, Clément & Sessitsch 2010; Compant *et al.* 2011; Mandl *et al.* 2015).

## ii. Colonisation de la plante

La diversité et la spécialisation des microorganismes sont inversement proportionnelles du sol vers l'endosphère racinaire (Müller *et al.* 2016) (Figure 1). En effet, la diversité des microorganismes du sol est grande (1 gramme de sol contient jusqu'à 1 milliard de cellules bactériennes, comprenant des dizaines de milliers de taxons, jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques - (FAO, ITPS, GSBL, CBD & EC 2020) et les interactions biologiques y sont complexes (Buée *et al.* 2009; Nannipieri *et al.* 2017; Compant *et al.* 2019). Le sol est ainsi considéré comme le réservoir primaire de microorganismes pour les plantes (Zarraonaindia *et al.* 2015). *A contrario*, les microorganismes colonisant l'endosphère racinaire sont considérés moins nombreux et diversifiés ( $\sim 10^5 - 10^7$  cellules par gramme de racine) mais plus spécialistes (Bulgarelli *et al.* 2013; Compant *et al.* 2021) (Figure 1).





La colonisation des plantes par les microorganismes au niveau du sol peut être décrite comme un processus dynamique incluant deux principaux mécanismes : la colonisation par les microorganismes pionniers ("priority effect") capables de passer les barrières écologiques et physiques de la rhizosphère

## Introduction générale

puis de la racine (Werner & Kiers 2015) et la sélection préférentielle de certains microorganismes par la plante (“préférence d’hôte” ou “host preference”) en fonction de ses besoins (Vandenkoornhuysse *et al.* 2015; Leopold & Busby 2020) (Figure 2). Ces deux mécanismes sont supposés être dynamiques avec une diminution du “priority effect” au cours du temps en faveur de la “préférence d’hôte” (Werner & Kiers 2015) (Figure 2). Les racines sont donc le siège d’interactions complexes et ciblées entre la plante et son microbiote. Les microorganismes qui les colonisent peuvent donc être considérés comme la fraction la plus intime du microbiote associé aux plantes.

### iii. Les racines : haut lieu d’interactions plante - microorganismes

La racine constitue une niche microbienne très particulière puisqu’elle est le lieu de différents mécanismes connus pour influencer l’assemblage de ces communautés en réponse à des fonctions écologiques clés de la plante. Au niveau de la racine, la plante est capable de sécréter des métabolites carbonés complexes (exsudats racinaires) modulant les assemblages microbiens (Reinhold-Hurek *et al.* 2015; Sasse, Martinoia & Northen 2018). Les exsudats racinaires sont principalement composés de sucres, acides aminés, acides organiques et de polysaccharides (Badri & Vivanco 2009). Cette allocation carbonée, supposée préférentielle, permet le recrutement de certains microbes en fonction des besoins de la plante (Kiers *et al.* 2011; Vannier *et al.* 2015). De plus, il a été montré que ces exsudats racinaires peuvent agir sur la communication intercellulaire et de ce fait, prévenir les attaques de pathogènes (rôle antimicrobien) et moduler les assemblages microbiens (i.e. quorum systems - QS) (Zúñiga *et al.* 2017). Il est intéressant de noter que ces exsudats racinaires, même si synthétisés par la plante, peuvent être modulés en retour par les microorganismes associés aux racines ou à la rhizosphère (Olanrewaju *et al.* 2019). Par exemple, il a récemment été montré que la composition des exsudats racinaires sécrétés par la tomate pouvait être modifiée par le microbiote rhizosphérique (Korenblum *et al.* 2020). Les auteurs ont proposé de nommer ce processus SIREM (systemically induced root exudation of metabolites) (Korenblum *et al.* 2020). En particulier, ils ont démontré que la présence d’une bactérie spécifique (*Bacillus subtilis*) favorise la sécrétion d’acyl-sucrose par les racines, métabolite jusqu’alors essentiellement décrit au niveau de la phyllosphère (protection contre les insectes et certains champignons) (Korenblum *et al.* 2020). En plus de la sécrétion d’exsudats qui impactent la structuration des communautés microbiennes, la plante est capable de moduler son microbiote par son système immunitaire inné (Vandenkoornhuysse *et al.* 2015; Fitzpatrick *et al.* 2020). En effet, pour contrer les pathogènes ayant réussi à franchir l’ensemble des barrières physiques et chimiques, les plantes possèdent un système immunitaire très efficace du fait de l’absence de cellules immunitaires mobiles (Nishad *et al.* 2020). Ainsi, selon le modèle de coévolution en zigzag adopté à ce jour (Jones & Dangl 2006), deux formes de systèmes immunitaires existent chez les plantes et sont dépendants du type de molécules qu’ils ciblent : le PTI (pattern-triggered immunity) et le ETI (effector-triggered immunity) (Nishad *et al.* 2020). Le premier (PTI) est déclenché par des motifs particuliers (MAMP/PAMP/DAMP) reconnus par les récepteurs membranaires de la plante (PRRs), motifs généralement présents à la surface de ces derniers

## Introduction générale

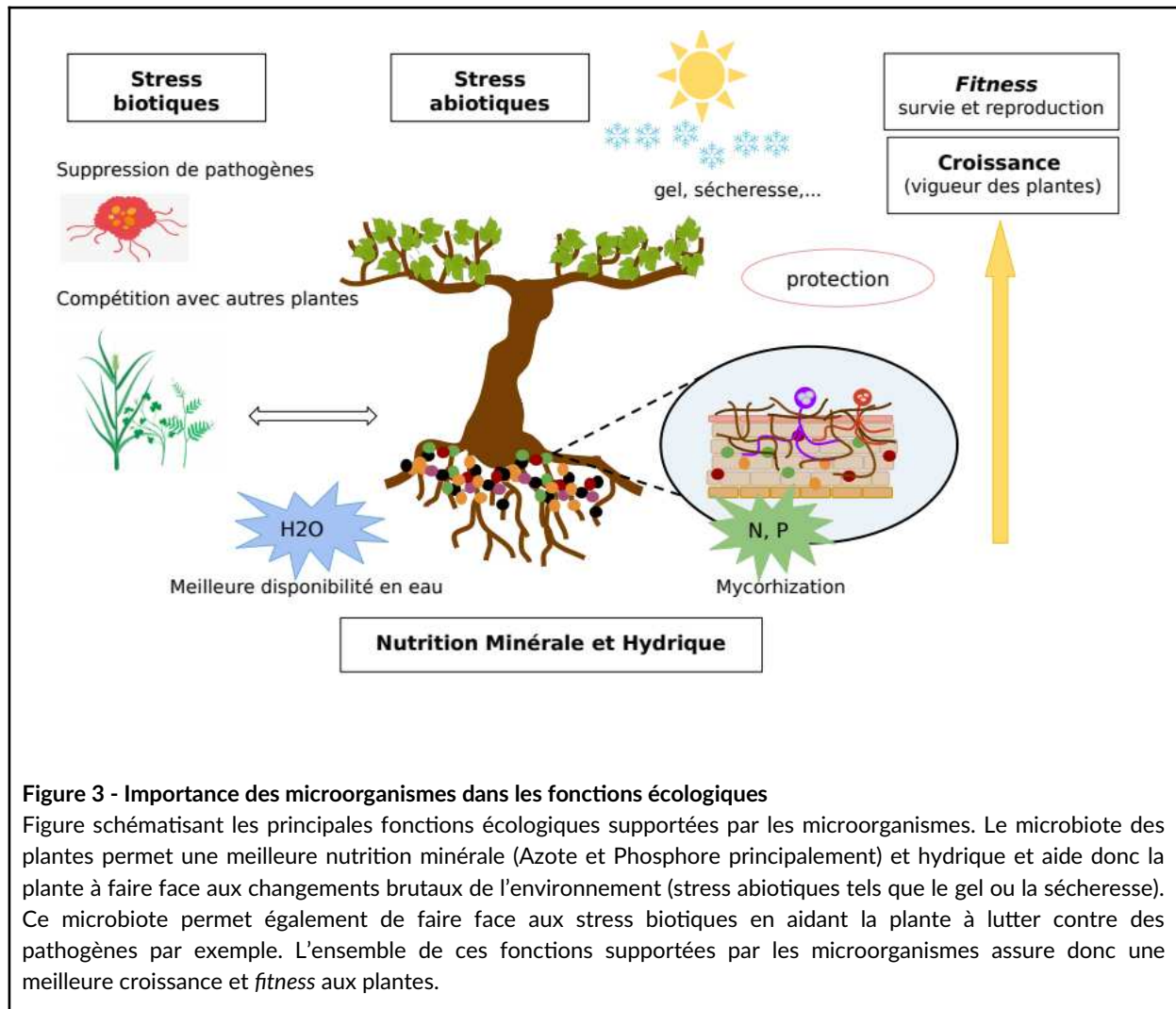
(Saijo, Loo & Yasuda 2018). Le second système (ETI), considéré comme plus sophistiqué, est basé sur la reconnaissance d'effecteurs, tels que des facteurs de virulence exprimés par les pathogènes pour contrer le système de base de défense (EPI) (Dangl & Jones 2001). La mise en place de ce système immunitaire au niveau des racines, même s'il est essentiel à la lutte contre les pathogènes, peut, à son tour, modifier les assemblages microbiens, en particulier le comportement des microorganismes symbiotiques (Hiruma *et al.* 2016). La racine est également le lieu d'associations symbiotiques, avec, en particulier les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF, Arbuscular Mycorrhizal Fungi) largement impliqués dans la nutrition hydrique et minérale de la plante (Smith & Read 2009). Par exemple, il a été montré que la captation d'azote était cinq fois plus importante pour une plante mycorhizée et jusqu'à vingt-cinq plus fois importante pour le phosphore (Van Der Heijden, Wiemken & Sanders 2003; Vogelsang, Reynolds & Bever 2006). L'efficacité de captation des ressources des AMF repose sur la capacité des hyphes fongiques à se propager en profondeur dans le sol et dans les interstices, et donc d'absorber les ressources généralement inaccessibles par les racines (Begum *et al.* 2019). Ces quelques exemples d'interactions entre la plante et les microorganismes au niveau racinaire et des modulations pouvant être initiées par la plante elle-même selon ses besoins (p.ex. nutrition, croissance), ou par les microorganismes à proximité (p.ex. symbiose, pathogène), soulignent l'importance des analyses de ce bio-compartiment pour une meilleure compréhension des mécanismes d'assemblage des communautés microbiennes.

### **b. Fonctions des microorganismes pour les plantes**

#### **i. Généralités**

Le microbiote, et en particulier les microorganismes endophytes, assurent des fonctions écologiques majeures pour les plantes et impactent, de ce fait, leur phénotype. L'importance de ce compartiment microbien sur la santé des plantes, qu'elles vivent en milieu naturel ou cultivé, a permis la montée en puissance des études, et donc des connaissances, autour des thèmes associés à l'écologie microbienne fondamentale ou appliquée. Les plantes, du fait de leur immobilité, ne peuvent fuir devant un danger et doivent donc faire face aux variations, parfois brutales, de leurs conditions de vie. Elles ont donc, entre autres, mis en place des stratégies de coévolution et de survie en lien avec les microorganismes (symbiotiques et pathogéniques) les colonisant ou à proximité (Delaux & Schornack 2021). Dans la littérature, on trouve ainsi de nombreux exemples de champignons ou bactéries symbiotiques reconnus comme coopérateurs des plantes et leur conférant une plus grande tolérance aux stress biotiques et abiotiques ainsi qu'une meilleure accessibilité aux nutriments naturels (p.ex. Müller *et al.* 2016; Compant *et al.* 2019) (Figure 3). Quelques exemples sont détaillés dans les paragraphes suivants.





## ii. Nutrition hydrique et minérale

Le rôle des microorganismes dans la nutrition minérale et hydrique des plantes est bien documenté. Dans la nature, la plupart des éléments nutritifs (phosphore - P, azote - N, soufre - S) sont associés à des molécules organiques complexes non assimilables par les plantes sous cette forme (van der Heijden, Bardgett & van Straalen 2008; Jacoby *et al.* 2017). Les microorganismes sont eux-mêmes capables de métaboliser ces formes organiques (dépolymérisation et minéralisation). Suite à différents mécanismes (lyse cellulaire, renouvellement du contenu cellulaire ou attaque de protozoaire), le contenu cellulaire des microorganismes est libéré dans l'environnement sous forme de nutriments inorganiques assimilables par les plantes (Richardson *et al.* 2009; Bodenhausen *et al.* 2019). Beaucoup d'études se sont focalisées sur les microorganismes symbiotiques, les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) et les bactéries du genre *Rhizobium* (nodules et fixation de l'azote atmosphérique), et ont démontré leur rôle dans la captation des nutriments minéraux essentiels aux plantes (Smith & Read 2009; Smith, Grace & Smith 2009). Les champignons mycorhiziens, grâce à leurs hyphes, pénètrent en profondeur l'environnement souterrain pour la recherche de nutriments et ils peuvent également stimuler la production d'exsudats

## Introduction générale

racinaires pour une meilleure absorption des nutriments à proximité directe des racines (Courty *et al.* 2010; Cairney 2011; Begum *et al.* 2019). Par ailleurs, selon le type de champignons mycorhiziens, deux systèmes de nutrition existent : stratégie de conservation (champignons ectomycorhiziens - faible taux de minéralisation de l'azote du sol et capacité à dégrader et absorber l'azote organique) et stratégie d'acquisition "directe" (champignons endomycorhiziens, notamment les AMF - taux élevés de minéralisation de l'azote, essentiellement inorganique, dans le sol) (Averill *et al.* 2019). D'autres microorganismes, des bactéries considérées comme non symbiotiques, sont également impliqués dans la nutrition hydrique et minérale des plantes puisqu'elles permettent une meilleure biodisponibilité et sont capables de modifier l'architecture racinaire pour une augmentation des capacités exploratoires des racines (Richardson & Simpson 2011; Pieterse *et al.* 2014; Backer *et al.* 2018). Le sol et les racines ne sont cependant pas les seuls environnements dans lesquels les microorganismes aident à la nutrition hydrique et minérale des plantes. Par exemple, dans certaines forêts tropicales, des études ont montré le transfert à la plante d'azote atmosphérique fixé par des cyanobactéries et des protéobactéries (p.ex. Fűrnkranz *et al.* 2008). Selon ses besoins ou selon les colonisateurs, différentes stratégies de captation de nutriments peuvent donc être adoptées par la plante, ce qui lui permet de faire face aux variations des facteurs environnementaux.

### iii. Résistance aux stress abiotiques

De par leur rôle fondamental dans la nutrition hydrique et minérale, les microorganismes, et notamment les mutualistes, permettent à la plante de tamponner les perturbations de son environnement, qu'elles soient d'origine biotique ou abiotique (Yang *et al.* 2013). Les stress abiotiques les plus étudiés et connus auxquels les plantes doivent faire face sont ceux qui impactent la production agricole. Il s'agit essentiellement de la salinité, la sécheresse, la présence de métaux lourds, le manque de nutriments et les variations brutales de température, causant généralement des baisses de croissance, des dommages membranaires, une mauvaise balance ionique cellulaire ou encore une inhibition de la photosynthèse (Inbaraj 2021). De plus, ces conditions abiotiques défavorables sont fréquemment inter-connectées les unes aux autres. Par exemple, une forte salinité est sensiblement liée à la sécheresse qui elle-même est généralement accentuée par de fortes températures (Slama *et al.* 2015). Par exemple, il a été montré, et ce pour différentes plantes, que les champignons mycorhiziens (AMF) étaient capables d'augmenter la tolérance à la salinité en améliorant la captation de nutriments (Giri, Kapoor & Mukerji 2003; Giri & Mukerji 2004; Al-Karaki 2006; Cho *et al.* 2006; Porrás-Soriano *et al.* 2009; Belew *et al.* 2016). Outre les AMF, d'autres microorganismes sont également capables de conférer une plus grande tolérance à la salinité, comme les bactéries du genre *Rhizobium*, via la production de tréhalose (Song *et al.* 2017; Sharma *et al.* 2020). Un autre exemple significatif est la tolérance à la sécheresse. Ainsi, il a été montré qu'en conditions défavorables, les AMF sont capables de maintenir élevées la conductance stomatique et l'efficacité de la photosynthèse (p.ex. Augé *et al.* 2015; Mirshad & Puthur 2016; Chareesri *et al.* 2020). Les rhizobactéries sont également capables d'améliorer la tolérance des plantes à la sécheresse grâce,

## Introduction générale

entre autres, à leur faculté à produire des phytohormones responsables de la croissance végétale (acide indole 3-acétique - IAA ou acide abscissique - ABA), ou encore, par leur action protectrice de l'intégrité cellulaire des chloroplastes ou par l'amélioration des capacités photosynthétiques des plantes (Jiang *et al.* 2013; Goswami, Thakker & Dhandhukia 2015; Rolli *et al.* 2015; Naylor & Coleman-Derr 2018; Zhang *et al.* 2019). De plus, et en particulier dans les systèmes agricoles, la teneur en métaux lourds tel que le cuivre (Cu) peut sensiblement affecter la santé des plantes (Komárek *et al.* 2010). Il a été montré que les champignons mycorhiziens étaient capables de contrer l'effet délétère de fortes teneurs en métaux lourds dans les sols (Leyval, Turnau and Haselwandter 1997; Hildebrandt, Regvar and Bothe 2007; Riaz *et al.* 2021), notamment grâce à leur absorption dans la paroi cellulaire des hyphes fongiques (Christie, Li & Chen 2004) ou par la production de molécules chélatrices des métaux (Khan 2006).

### iv. Résistance aux stress biotiques

En plus de leur rôle fondamental dans la gestion des stress abiotiques auxquels les plantes doivent faire face, les microorganismes sont également impliqués dans la résistance des plantes aux contraintes biotiques (Mendes *et al.* 2011; Mendes, Garbeva & Raaijmakers 2013). Les pathogènes ou parasites des plantes constituent l'un des stress biotiques les plus étudiés du fait de son importance dans les agrosystèmes. Les microorganismes endophytes, champignons et bactéries, sont capables de protéger les plantes en émettant des composés ciblés contre les pathogènes (Nishad *et al.* 2020). Les molécules de défense secrétées par ces microorganismes sont variées, peuvent agir directement ou indirectement sur les pathogènes et sont généralement synthétisées par un complexe de plusieurs taxa microbiens (Trivedi *et al.* 2020). Les molécules produites par les bactéries sont généralement des métabolites antifongiques (antibiotiques) et des composés volatiles, inhibiteurs de champignons (Hol *et al.* 2015; Cha *et al.* 2016). Par exemple, certaines bactéries du genre *Streptomyces* sont bien décrites comme productrices d'antibiotiques capables de lutter contre un grand nombre de pathogènes des plantes (Olanrewaju & Babalola 2019). Par ailleurs, l'étude du pathogène fongique *Rhizoctonia solani*, un pathogène commun aux cultures de betteraves sucrières, de pommes de terre ou encore de tomates, a permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs taxa bactériens dans la résistance à ce champignon (Mendes *et al.* 2011). Ainsi, dans le cas de la betterave sucrière, les auteurs ont mis en évidence le rôle des  $\gamma$ -protéobactéries (de la famille des *Pseudomonas* en particulier), associées à des *Burkholderiaceae*, des *Xanthomonadales*, et des *Actinobacteria*, dans la résistance à ce pathogène (Mendes *et al.* 2011). La production d'enzymes (lipopeptide choré encodé par les gènes NRPS non-ribosomal peptides synthetase) assure la protection de la plante (Mendes *et al.* 2011). *Alternaria alternata*, un champignon endophyte, est capable de produire des toxines (dicétopipérazines) inhibitrices de la sporulation de *Plasmopara viticola*, l'agent responsable du mildiou (Musetti *et al.* 2006). Outre la production de molécules, certains champignons sont capables de physiquement s'attaquer à l'agresseur. Récemment, des chercheurs ont identifié des espèces de *Fusarium*, parasites de *Plasmopara viticola* (mildiou), capables de s'enrouler autour et à l'intérieur des sporangiophores de *P. viticola*, causant la lyse cellulaire du pathogène et inhibant la production de

## Introduction générale

sporanges (Ghule *et al.* 2018). Les champignons mycorrhiziens (AMF) peuvent également lutter contre les pathogènes des plantes (Selosse, Baudoin & Vandenkoornhuyse 2004). Bien qu'aucun composé antimicrobien produit par les AMF n'ait été pour l'instant décrit dans la littérature, ces champignons mycorrhiziens, qui colonisent les plantes, sont connus pour lutter contre les attaques biotiques en induisant une résistance systémique de la plante (Jung *et al.* 2012; Nishad *et al.* 2020). On parle alors de MIR (mycorrhiza-induced resistance), c'est-à-dire une réponse systémique accrue de la plante suite à la colonisation des AMF (Cameron *et al.* 2013). La réponse systémique induite permet de lutter contre un large panel de pathogènes microbiens mais aussi contre les nématodes, les arthropodes herbivores ainsi que les virus (Elsen *et al.* 2008; Vos *et al.* 2012; Song *et al.* 2013; Sanchez-Bel *et al.* 2016; Aseel, Rashad & Hammad 2019), avec toutefois, un questionnement toujours ouvert autour de la lutte virale (Miozzi *et al.* 2019). Ces quelques exemples de propriétés des microorganismes à lutter contre les agresseurs biotiques des plantes, ainsi que le nombre croissant de publications et de programmes de recherches autour du biocontrôle, montrent bien l'importance des communautés microbiennes dans la santé de la plante et pour une agriculture plus durable, non délétère pour l'environnement.

### v. Croissance et fitness

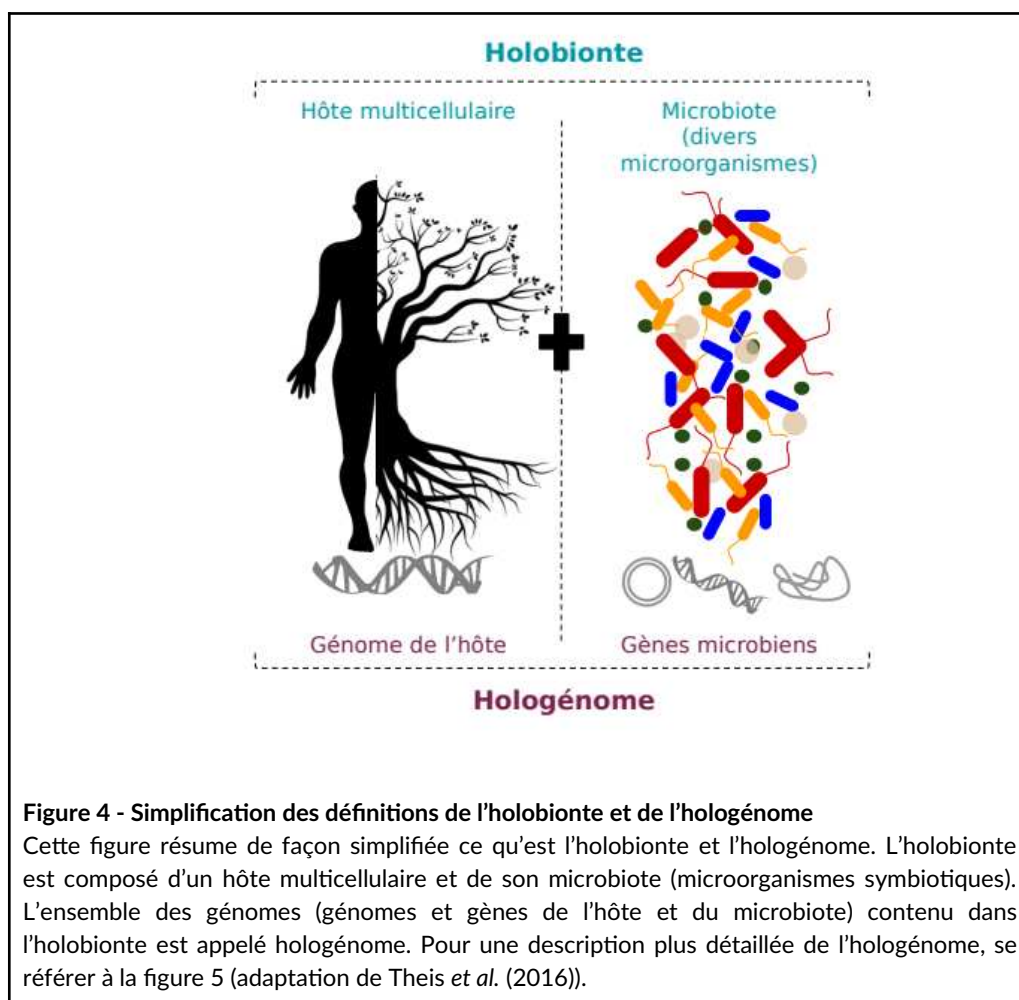
Du fait de leur rôle essentiel dans la nutrition et la protection des plantes, les microorganismes sont donc largement impliqués dans la croissance et la *fitness* (succès reproducteur, valeur adaptative et survie) des plantes (Lau & Lennon 2012). De plus, les microorganismes ont un impact sur la production de biomasse (Sugiyama *et al.* 2013) ou encore, la période de floraison (Panke-Buisse *et al.* 2015). Récemment, Fitzpatrick et ses collègues (2019) ont révélé un effet bénéfique du microbiote du sol sur la *fitness* de *Arabidopsis thaliana* (production de graines) et particulièrement, lors d'épisodes de stress hydriques (Fitzpatrick, Mustafa & Viliunas 2019). D'autres auteurs ont démontré l'effet bénéfique d'un champignon, *Colletotrichum tofieldiae*, sur la croissance racinaire et la *fitness* de *Arabidopsis thaliana* uniquement en condition de carence en phosphore (Hiruma *et al.* 2016). De plus, Lopes et ses collègues (2018), ont établi un effet stimulateur de l'inoculation de deux rhizobactéries (*Pseudomonas fluorescens* et *Burkholderia pyrrocinia*) sur le développement racinaire, la croissance et la productivité de *Brachiaria brizantha* (dos Santos Lopes *et al.* 2018). Par ailleurs, de nombreuses études de co-inoculation de microorganismes connus pour favoriser la croissance des plantes (PGPM, Plant Growth-Promoting Microbes) ont montré, chez différents modèles biologiques, un effet bénéfique synergique sur la croissance, la germination et la qualité des plantes (p.ex. *Triticum spp.* : Upadhyay *et al.* 2012; *Glycine max L.* : Bakhshandeh *et al.* 2020; *Capsicum annuum L.* : Samaddar *et al.* 2019). Malgré le nombre croissant d'études portant sur l'impact du microbiote sur la croissance et la survie des plantes, les mécanismes d'interaction entre plantes et microorganismes restent encore très peu élucidés. Ces mécanismes semblent être fortement dépendants de la plante hôte mais également des interactions microbiennes mises en place au sein de l'hôte.

Tout au long de ce paragraphe, j'ai cherché à montrer, via des exemples d'études sur différents modèles biologiques, la réelle importance des microorganismes pour les plantes et les interactions complexes, encore peu comprises, qui s'établissent entre un hôte et son cortège microbien. Les fonctions de nutrition minérale et hydrique, de résistance aux stress environnementaux et biotiques ne sont plus à démontrer et renforcent l'idée qu'une plante, comme tout être vivant, ne peut être plus longtemps considérée comme une seule et unique entité.

## II. Théorie de l'holobionte : *Nous ne sommes pas seuls Mulder!*

### a. Généralités et émergence des concepts

A l'origine de cette théorie, et bien avant que les termes phares de "holobionte" (un hôte multicellulaire et ses symbiotes - du grec *holo*, "tout", et *bios*, "vie") et "hologénome" (l'ensemble des gènes au sein de l'holobionte, i.e., gènes de l'hôte et de son microbiote (Figures 4 et 5)) ne soient proposés et officiellement définis, des travaux clés ont été réalisés sur la symbiose et les coraux (Lynn Margulis et Forest Rohwer) (Figure 4).



**Figure 4 - Simplification des définitions de l'holobionte et de l'hologénome**

Cette figure résume de façon simplifiée ce qu'est l'holobionte et l'hologénome. L'holobionte est composé d'un hôte multicellulaire et de son microbiote (microorganismes symbiotiques). L'ensemble des génomes (génomés et gènes de l'hôte et du microbiote) contenu dans l'holobionte est appelé hologénome. Pour une description plus détaillée de l'hologénome, se référer à la figure 5 (adaptation de Theis et al. (2016)).

## Introduction générale

Lynn Margulis, une célèbre biologiste, spécialiste de la symbiose, est notamment connue pour avoir ré-introduit l'hypothèse de l'origine symbiotique des cellules eucaryotes et l'importance de ces symbioses pour la préservation de la vie sur Terre et dans les processus d'évolution (Margulis 1990, 1991, 1998, (Margulis 2010)). Lynn Margulis est également la première personne à avoir introduit le terme d' "holobionte" pour décrire l'existence d'une entité biologique issue de la fusion/collaboration de deux espèces (travaux l'héritabilité cyclique de la symbiose en comparaison à la méiose; Margulis 1990) ainsi que pour nommer un "symbiote composé de biontes reconnaissables" (Margulis 1991). Le terme "holobionte" utilisé par Lynn Margulis se réfère donc à la notion d'héritabilité de la symbiose ("hereditary holobiont"), dans le cas de cellules eucaryotes, mais inclut également les associations symbiotiques composées de nombreux biotes (bios, "vie") de l'environnement (ce dernier point étant réaffirmé dans Guerrero 2013). Quelques années plus tard, Forest Rohwer, un chercheur spécialiste des coraux, a utilisé le terme d'"holobionte" pour qualifier un hôte et l'ensemble des espèces microbiennes qui lui sont associées (Rohwer *et al.* 2002; Knowlton & Rohwer 2003), se référant donc plus à la vision "écologique" de l'holobionte que celle d'"héritabilité" de Margulis. Forest Rohwer et ses collègues (2003) définirent alors l'"holobionte" comme la communauté écologique qui est composée du corail, de ses endosymbiotes naturels mais également des nombreuses espèces microbiennes constituant son microbiote (Knowlton & Rohwer 2003).

Quelques années plus tard, Illana Zilber-Rosenberg et Eugène Rosenberg ré-introduisirent et développèrent ce terme d'"holobionte" (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008). Ces auteurs conceptualisèrent l'importance des relations hôte-microorganismes dans l'ensemble du vivant et proposèrent la théorie de l'évolution de l'hologénome (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008). Un fait important de cette théorie est qu'elle englobe littéralement les deux définitions de l'holobionte (Lynn Margulis, "héréditaire" et Forest Rohwer, "écologique"), supposées être "contradictoires" ou du moins "incohérentes", et postulent que l'holobionte et son hologénome doivent être définis comme une unité de sélection dans l'évolution (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008).

*'In the hologenome theory of evolution, we suggest that the holobiont (Margulis, 1993; Rohwer et al., 2002) (the host and its symbiotic microbiota) with its hologenome, acting in consortium, should be considered a unit of selection in evolution, and that relatively rapid variation in the diverse microbial symbionts can have an important role in the adaptation and evolution of the holobiont.'*

*(Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008).*

*'Dans la théorie de l'évolution de l'hologénome, nous suggérons que l'holobionte (Margulis, 1993; Rohwer et al., 2002) (l'hôte et son microbiote symbiotique) avec son hologénome, agissant en consortium, devrait être considérés comme une unité de sélection dans l'évolution, et que la variation relativement rapide des divers symbiotes microbiens peut avoir un rôle important dans l'adaptation et l'évolution de l'holobionte'. (traduit de Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008).*

## Introduction générale

Zilber-Rosenberg et Rosenberg proposèrent alors que cette hypothèse de la théorie de l'évolution de l'hologénome reposait sur des observations importantes du monde du vivant: les plantes et les animaux vivent en symbiose avec un large éventail de microorganismes; les microorganismes symbiotiques peuvent être transmis entre générations; les interactions hôtes-microorganismes impactent la *fitness* de l'holobionte dans un environnement donné; les variations génétiques de l'holobionte peuvent être le résultat d'incorporations de nouveaux microorganismes présents dans l'environnement (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008). Puisque les microorganismes, très abondants dans tous les écosystèmes, sont capables de répondre plus rapidement à des changements de l'environnement (mécanisme de transferts horizontaux de gènes par exemple), ils offrent à l'hôte un panel de nouvelles possibilités et de fonctions pour permettre son adaptation aux fortes variabilités environnementales (Tierney *et al.* 2019).

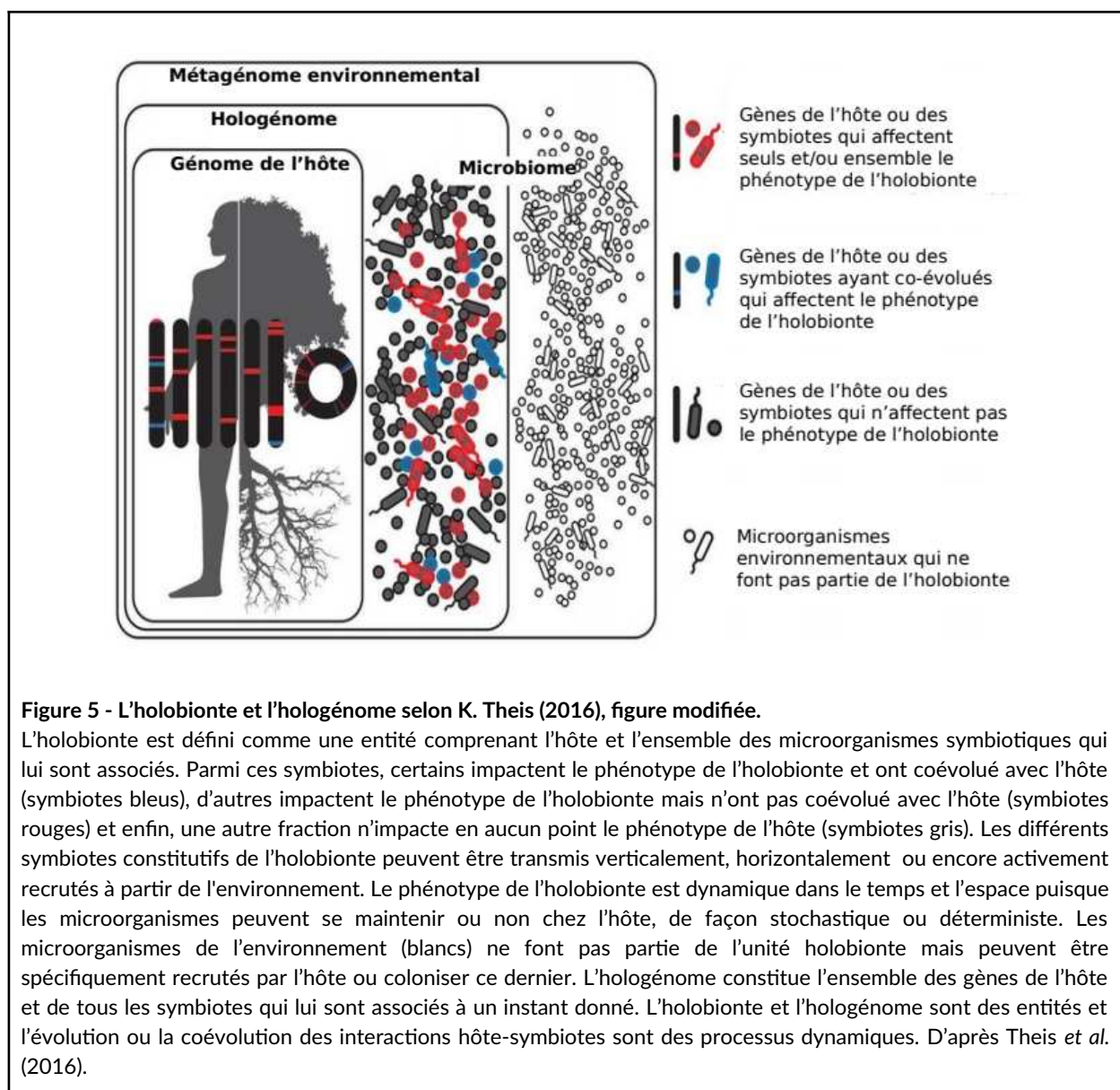


Figure 5 - L'holobionte et l'hologénome selon K. Theis (2016), figure modifiée.

L'holobionte est défini comme une entité comprenant l'hôte et l'ensemble des microorganismes symbiotiques qui lui sont associés. Parmi ces symbiotes, certains impactent le phénotype de l'holobionte et ont coévolué avec l'hôte (symbiotes bleus), d'autres impactent le phénotype de l'holobionte mais n'ont pas coévolué avec l'hôte (symbiotes rouges) et enfin, une autre fraction n'impacte en aucun point le phénotype de l'hôte (symbiotes gris). Les différents symbiotes constitutifs de l'holobionte peuvent être transmis verticalement, horizontalement ou encore activement recrutés à partir de l'environnement. Le phénotype de l'holobionte est dynamique dans le temps et l'espace puisque les microorganismes peuvent se maintenir ou non chez l'hôte, de façon stochastique ou déterministe. Les microorganismes de l'environnement (blancs) ne font pas partie de l'unité holobionte mais peuvent être spécifiquement recrutés par l'hôte ou coloniser ce dernier. L'hologénome constitue l'ensemble des gènes de l'hôte et de tous les symbiotes qui lui sont associés à un instant donné. L'holobionte et l'hologénome sont des entités et l'évolution ou la coévolution des interactions hôte-symbiotes sont des processus dynamiques. D'après Theis *et al.* (2016).

## b. Transmission du microbiote

Il existe différents modes de transmission du cortège microbien au sein de l'holobionte dont les transmissions verticales (transmission à partir des plants parents) et horizontales (recrutement à partir de l'environnement) (pour une revue détaillée des modes de transmissions et mécanismes associés, se référer par exemple à Baltrus 2017; Vannier *et al.* 2019; Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2021).

La transmission verticale garantit la persistance de certains microorganismes des parents à la descendance. La transmission verticale du microbiote, ou "hérité" des générations antérieures, a principalement été étudiée chez les graines (Truyens *et al.* 2015; Shade, Jacques & Barret 2017). Par exemple, Johnston-Monje et ses collègues (2016) ont montré la présence de taxa dominants (Proteobacteria et Bacteroidetes) dans la rhizosphère de maïs juvéniles ayant germé dans des sols stériles ou non stériles (Johnston-Monje *et al.* 2016). Dans cette étude, même si la rhizosphère des plants cultivés dans un substrat non stérile présentait une plus forte diversité microbienne, les auteurs conclurent que ces taxa dominants étaient transmis par la graine (Johnston-Monje *et al.* 2016). Récemment, Faddetta et ses collègues (2021) ont clairement démontré la transmission du microbiote de la graine vers la plante chez le citronnier par séquençage et hybridation *in situ* en fluorescence couplée à de la microscopie confocale à balayage laser (Faddetta *et al.* 2021). Ils ont particulièrement montré que les pousses régénérées à partir de graines stérilisées et mises en culture dans des conditions aseptiques présentaient un microbiote dont la structure et la distribution présentait des similitudes avec le microbiote des graines (Faddetta *et al.* 2021). Cependant, d'autres auteurs ont montré, dans une récente étude sur le riz, que la transmission verticale des communautés bactériennes par la graine était très faible voire absente de la graine vers les racines et la rhizosphère (Guo *et al.* 2021). Ces auteurs soulignent l'importance des forces déterministes propres à chaque génotype et habitat de la plante hôte dans l'assemblage des communautés bactériennes et mettent en avant la dominance des transferts horizontaux dans la structuration des communautés des racines et de la rhizosphère (Guo *et al.* 2021). Chez les champignons endophytes, certaines études ont montré la capacité de l'hyphes fongique à pénétrer la graine afin d'être transmis à la descendance (p. ex. Gibert, Magda & Hazard 2015). De plus, ces hyphes mycorhiziens sont également capables de pénétrer des grains de pollen ce qui leur assure une transmission verticale à relativement large échelle vers divers hôtes (Hodgson *et al.* 2014). Un autre exemple de transmission verticale existe chez les plantes clonales. Dans un réseau de plantes clonales, l'organisation et l'occupation de l'espace, et donc des ressources, se fait grâce aux stolons le long desquels se développent les ramets clonaux (individu potentiellement autonome et génétiquement identique au plant mère). Ainsi, Vannier et ses collègues (2018, 2019) ont récemment démontré l'existence d'un transfert non aléatoire d'un sous-ensemble du microbiote de la mère à des plantes filles clonales (Vannier *et al.* 2018, 2019). Tout comme les exemples détaillés ci-dessus pour différents modèles de plantes, il semble acceptable de convenir que la vigne "naturelle" doit elle aussi posséder une stratégie de transmission verticale puisqu'elle produit des baies qui renferment des graines pour sa reproduction. Cependant, à ma connaissance, aucune étude n'a analysé la



## Introduction générale

transmission verticale chez ce modèle biologique. Ce processus est d'autant plus méconnu dans le cadre de la vigne cultivée puisque la majorité des plants de vignes sont obtenus par greffage.

La transmission horizontale, quant à elle, est beaucoup plus connue chez les plantes. Il est maintenant bien établi qu'une plante est capable de recruter activement certains microorganismes dans son environnement proche (réservoir local). De nombreux exemples existent dans la littérature et ce, chez de nombreux modèles biologiques (Frank 2017). Par exemple, il a été montré chez des légumineuses (Gopalakrishnan *et al.* 2015), mais également chez de nombreux modèles biologiques, tels que le maïs (Egamberdieva *et al.* 2007), le recrutement actif de Rhizobiales (bactéries promotrices de croissance). De plus, chez la vigne, Zarraonaindia *et al.* (2015) ont démontré que les communautés bactériennes épiphytes et endophytes de différents compartiments biologiques (feuilles, fleurs, raisins) étaient plus similaires aux communautés du sol qu'entre bio-compartiments (Zarraonaindia *et al.* 2015). Chez les champignons mycorhiziens à arbuscules, le développement et la propagation des hyphes dans l'environnement extérieur suivi de la pénétration des cellules de l'hôte permet le transfert horizontal de ces symbiotes de l'environnement vers la plante (Vandenkoornhuys *et al.* 2015). Par ailleurs, une autre forme de transmission horizontale, la transmission dite "pseudo-verticale" a également été proposée par certains auteurs comme des transmissions indirectes, médiées par l'environnement, des parents vers la descendance (Wilkinson 1997). Ce genre de transmission semble être avantageux pour les plantes puisque le coût de recrutement de symbiotes adaptés est faible (Wilkinson & Sherratt 2001). C'est notamment le cas des symbioses mycorhiziennes, où les graines germent à proximité de la plante maternelle et les symbiotes acquis dans l'environnement, par la descendance, sont en fait ceux des parents qui vivent dans le voisinage (Wilkinson 1997; Selosse *et al.* 2006).

Bien entendu, ces deux modes principaux de transmission (horizontale et verticale) du microbiote coexistent dans la nature (Ferreira *et al.* 2008; Bright & Bulgheresi 2010). Plus qu'une unité de sélection, l'holobionte représente une unité de coopération (Theis *et al.* 2016). Ainsi, de nombreux microorganismes (et leur génome) peuvent pénétrer les hôtes (transmission horizontale) et s'y maintenir par transmission verticale, du fait de leur intérêt fonctionnel. Dans un contexte d'holobionte et d'hologénome, comprendre l'importance des processus de coévolution d'un hôte et de son microbiote mais également, de l'héritabilité de ce dernier restent des questions très peu investiguées (Theis *et al.* 2016 Figure 5). Il est donc important d'étudier les mécanismes de transmissions horizontale et verticale des microorganismes afin d'essayer de mieux comprendre les processus coévolutifs sous-jacents.

### C. Holobionte et phénotypes

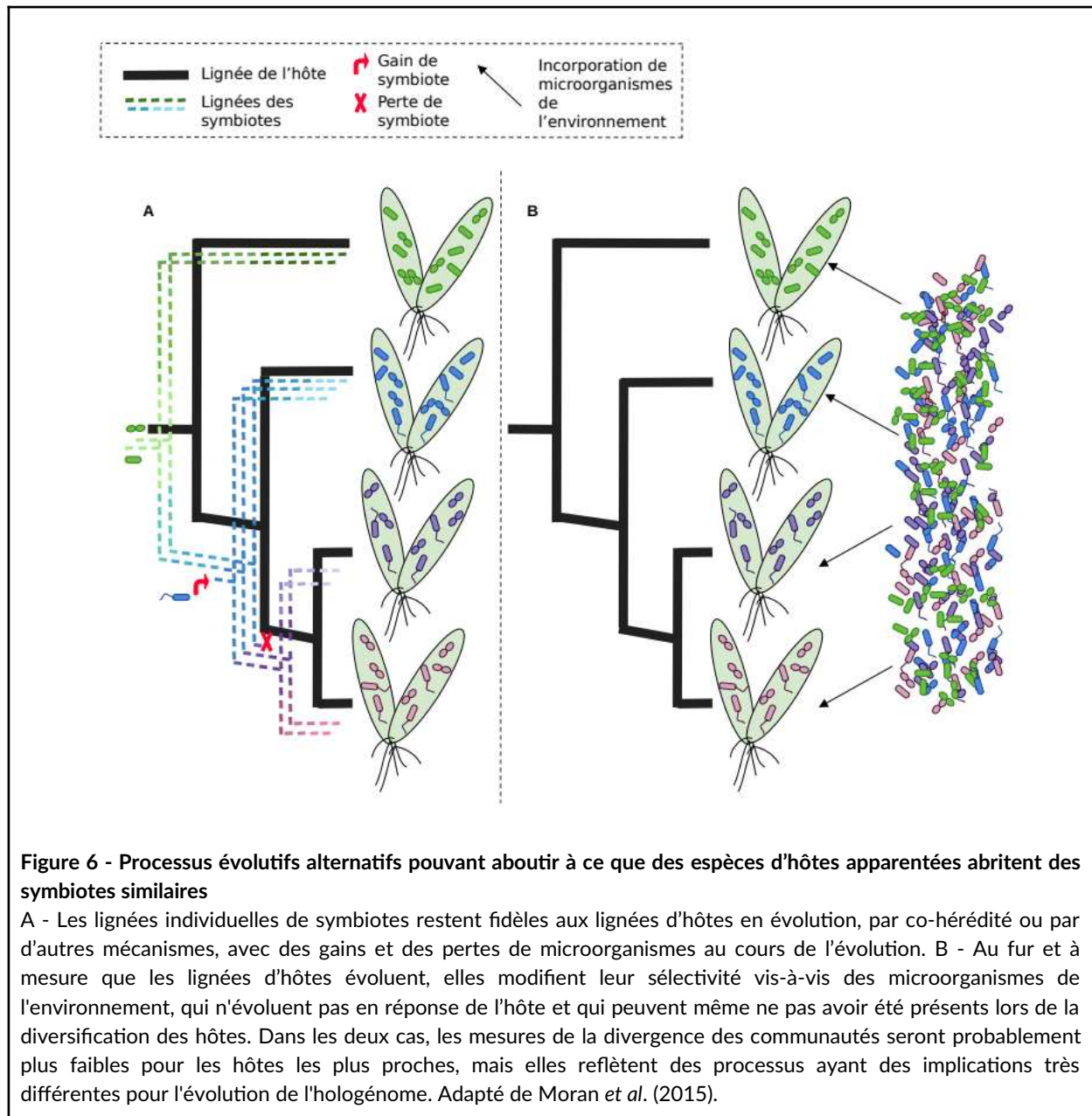
Le microbiote, et particulièrement les symbiotes, ont un impact profond sur le phénotype effectif de leur hôte et donc sur l'entité fonctionnelle holobionte. Ceci est vrai chez les animaux (p.ex. Rosenberg *et al.* 2010; Hanning & Diaz-Sanchez 2015; Blanton *et al.* 2016) mais également chez les plantes (p.ex. Vandenkoornhuys *et al.* 2015; Ravanbakhsh, Kowalchuk & Jousset 2021). Par exemple, il a été montré

## Introduction générale

que les ruminants étaient capables de digérer de l'herbe et d'assimiler la cellulose grâce à la présence de symbiotes intestinaux (Groussin *et al.* 2017) ou encore, que les drosophiles étaient capables de croître malgré des conditions de faibles teneurs en nutriments grâce à leur microbiote intestinal (Wong, Dobson & Douglas 2014). Plus surprenant, de plus en plus d'exemples impliquent le microbiote dans des modifications d'interactions sociales (modification des interactions entre espèces) ou encore, de stratégies d'accouplement et reproductives (Archie & Tung 2015; Morimoto, Simpson & Ponton 2017; Walsh, Heys & Lewis 2017). Tout comme les animaux et humains, et comme expliqué dans le paragraphe I (nutrition minérale et hydrique; résistances aux stress biotiques et abiotiques; croissance et *fitness*), le phénotype des plantes est également sous forte contrainte de leur microbiote (Hassani, Durán & Hacquard 2018). Les traits d'un organisme (les phénotypes) sont donc la résultante de chacune des unités constitutives de l'holobionte et sont modulés par les interactions de ces unités avec l'environnement ("phénotypes étendus"). Ce système complexe d'interactions entre hôte-microbiote-environnement assure la plasticité de l'unité fonctionnelle et impacte, ce de fait, le phénotype de l'hôte.

### d. Controverses et nécessité de preuves expérimentales

Ce changement de paradigme (*l'hôte et les symbiotes forment un tout*) a permis de mieux appréhender l'ensemble des symbioses entre organismes dans les sciences du vivant (Bordenstein & Theis 2015; Theis *et al.* 2016) (Figure 5). Seth Bordenstein et Kevin Theis, dans leur publication de 2015, ont cherché à résumer selon 10 principes, les théories de l'holobionte et de l'hologénome afin de les rendre plus claires, mais surtout, afin de permettre la mise en place d'évaluations expérimentales de telles théories (Bordenstein & Theis 2015). Comme dans tout changement de paradigme, certains chercheurs ont questionné la pertinence d'une telle idée (holobionte et hologénome comme unité de sélection) et si ce changement n'était pas plus distrayant qu'utile pour la compréhension des bases du vivant (Moran & Sloan 2015; Douglas & Werren 2016; Skilling 2016). Particulièrement, les critiques mettent en avant le fait que l'holobionte est possiblement composé de plusieurs unités séparées (hôte et son microbiote) qui maintiennent leur individualité par évolution puisqu'aucune preuve de coévolution stricte n'a été réellement démontrée. Par ailleurs, d'autres critiques soutiennent que les filtres environnementaux et les transferts horizontaux semblent plus modeler l'hôte et son microbiote (Moran & Sloan 2015) (Figure 6). Cependant, peu de chercheurs semblent rejeter totalement cette théorie de l'hologénome et reconnaissent l'élan de recherches dans ce domaine, insufflé par l'énoncé des théories et ses controverses. Par ailleurs, nombre d'entre eux soulèvent le fait qu'il manque cruellement de preuves expérimentales, pouvant appuyer en faveur ou non de l'existence de l'holobionte comme unité de sélection, et surtout, permettant de mieux comprendre comment des individualités, et des groupes d'individus, peuvent évoluer collectivement ou côte à côte (Madhusoodanan 2019). Une question urgente, mais n'ayant pas encore fait l'objet d'études expérimentales approfondies, est donc de tester la légitimité de la théorie de l'hologénome.



Selon la théorie de l'holobionte, une plante n'est pas seule et ses habitants participent à une myriade de fonctions écologiques. De nombreux exemples montrent un effet de la plante sur les assemblages microbiens (la préférence d'hôte par exemple), renforçant par ailleurs, la théorie de l'holobionte. Cependant, une grande hétérogénéité de diversité microbienne entre individus est constatée et interroge sur les facteurs qui gouvernent ces variations, si de tels facteurs existent. Dans l'hypothèse de la validité de la théorie de l'holobionte (et de l'hologénome), la compréhension de cette hétérogénéité observée du microbiote est donc importante à développer. Dans ce contexte, l'étude du microbiote de la vigne peut permettre de développer une base de connaissances importante tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué. Dans le paragraphe suivant sont détaillés les principaux facteurs qui ont été décrits pour avoir une influence sur le microbiote des plants de vigne (*terroir microbiologique*). Malgré

## Introduction générale

ce focus sur le *terroir microbiologique* de la vigne, cœur de cette thèse, certains exemples importants et analysés dans cette thèse seront développés sur d'autres modèles biologiques.

### III. Le terroir microbiologique de la vigne : Et si l'infiniment petit participait à la grandeur des vins

#### a. Beauté et complexité du terroir

La notion de *terroir*, notamment en viticulture, définit le caractère et la qualité des produits finis d'une région spécifique (Van Leeuwen & Seguin 2006). Les particularités organoleptiques et la texture d'un vin sont en effet largement déterminées par le lieu de culture et les pratiques appliquées. Ainsi, cette notion de *terroir* souligne que le lien entre les caractéristiques d'un produit et son origine géographique est le résultat d'interactions complexes entre un environnement typique (roche mère, topographie, porosité et propriétés physico-chimiques du sol), un climat particulier, des pratiques humaines et une histoire propre à chaque région ou vignoble (Barham 2003). Toute la subtilité et l'expression des *terroirs* viticoles sont donc soumises à cet ensemble complexe de facteurs puisque un même cépage, cultivé dans deux régions viticoles, produira des vins distincts (Van Leeuwen & Seguin 2006; Van Leeuwen, Roby & De Ressaiguié 2018). L'ampleur et l'hétérogénéité des facteurs associés à la définition du *terroir* viticole montrent donc la difficulté à trouver une définition consensuelle de ce qu'est le *terroir*.

Des études ont cependant montré qu'il existait des composés chimiques et sensoriels caractéristiques d'une région viticole pour un millésime donné via les techniques de "chemical fingerprints" (empreintes chimiques) (Pereira *et al.* 2005; González *et al.* 2009; Fotakis *et al.* 2013; Pepi & Vaccaro 2018). Ces études ont donc permis de corréler l'origine géographique d'un vin et sa composition. D'autres études ont montré l'importance des paramètres environnementaux locaux, et en particulier le climat (température, précipitations, radiations solaires), dans l'expression du *terroir*, via son influence sur la physiologie de la plante et sur la composition des baies (Jackson & Lombard, 1993; Gladstones 2011). Parmi les paramètres environnementaux locaux, le type du sol a également été associé à la spécificité du *terroir* via son effet sur la croissance des plantes et donc la composition du vin (Van Leeuwen, Roby & De Ressaiguié 2018). Ainsi, selon sa capacité de rétention de l'eau, la taille des particules et leur degré d'agrégation, et donc, la capacité de la plante et de ses racines à pénétrer la matrice, le sol influence largement la croissance de la plante, sa santé et donc la qualité des fruits produits (White, 2015). Il a également été démontré que les éléments traces du sol se retrouvaient dans la composition du vin (Kment *et al.* 2005).

Ces quelques exemples permettent donc de mesurer la multitude de facteurs pouvant impacter le *terroir* de la vigne et la composition du vin. De plus, et ce depuis moins de dix ans, une nouvelle dimension a été proposée à la définition du *terroir* : les microorganismes vivant à proximité et à

## Introduction générale

l'intérieur de la vigne et participant aux spécificités d'un *terroir*. Le terme de *terroir microbiologique* de la vigne a donc été proposé (Bokulich *et al.* 2014).

### b. Le terroir microbiologique

#### i. Généralités

Avec l'avancée majeure des techniques de biologie moléculaire, et particulièrement des techniques de séquençage (NGS : Next Generation Sequencing ou "Mass sequencing"), la capacité des chercheurs à étudier les communautés microbiennes a largement été améliorée. La résolution d'analyse, précédemment limitée par les études basées sur la culture de microorganismes, a considérablement augmenté et les connaissances sur le compartiment microbien, notamment associé aux plantes, ont explosé. L'ensemble de ces études a permis d'asseoir l'importance des microorganismes dans les écosystèmes et leur rôle fondamental dans les agroécosystèmes (Trivedi *et al.* 2021). Le concept de *terroir microbiologique* de la vigne est un exemple manifeste de leur importance (Gilbert, van der Lelie & Zarraonaindia 2014).

Un très grand nombre d'études se sont depuis intéressées à ce *terroir microbiologique* de la vigne. Il a été principalement analysé au niveau du sol (compartiment de microorganismes "potentiellement" recrutables par la plante), de la rhizosphère (sol à proximité des racines et/ou adhérent aux racines, dans ce cas, on parle aussi de rhizoplane), des raisins et plus rarement, au niveau de la phyllosphère (p.ex. Bokulich *et al.* 2014; Burns *et al.* 2015; Zarraonaindia *et al.* 2015; Miura *et al.* 2017; Singh *et al.* 2019). Par ailleurs, du fait de son intérêt dans les processus de production viticole, de nombreuses études ont étudié les microorganismes associés aux grappes et au moût de raisin (jus de raisins non fermenté composé de jus, de pulpe, de peaux, de pépins et de rafles) ainsi qu'aux ferments, contenant principalement les levures de fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* (p.ex Knight & Goddard 2015; Knight *et al.* 2015; Maturano *et al.* 2015; Burns *et al.* 2016). La plupart des études analysant le *terroir microbiologique* de la vigne s'accordent sur l'importance de la localisation du vignoble et de la géographie des *terroirs* analysés et confirment l'existence de modèles biogéographiques dans l'assemblage des communautés microbiennes.

#### ii. Biogéographie des microorganismes et règles d'assemblages

La biogéographie est généralement définie comme l'étude de la répartition de la biodiversité dans l'espace et le temps (Mac Arthur and Wilson 1967). Dans cette théorie (théorie des îles de Mac Arthur), l'un des principes fondateur de la biogéographie insulaire est l'existence de la dispersion (Mac Arthur and Wilson 1967). L'objectif principal de son étude est d'appréhender la répartition globale sur la terre et l'abondance des organismes, afin de tenter, *in fine*, de comprendre pourquoi ils vivent dans un endroit donné et comment ils coexistent (Hubbell, 2001, Vellend 2010). Traditionnellement, la plupart des études a été menée à larges échelles et les chercheurs se sont concentrés sur les mécanismes qui

## Introduction générale

influencent le plus les relations entre les espèces dans l'environnement, via l'analyse des processus locaux, tels que les facteurs abiotiques (Hubbell, 2001).

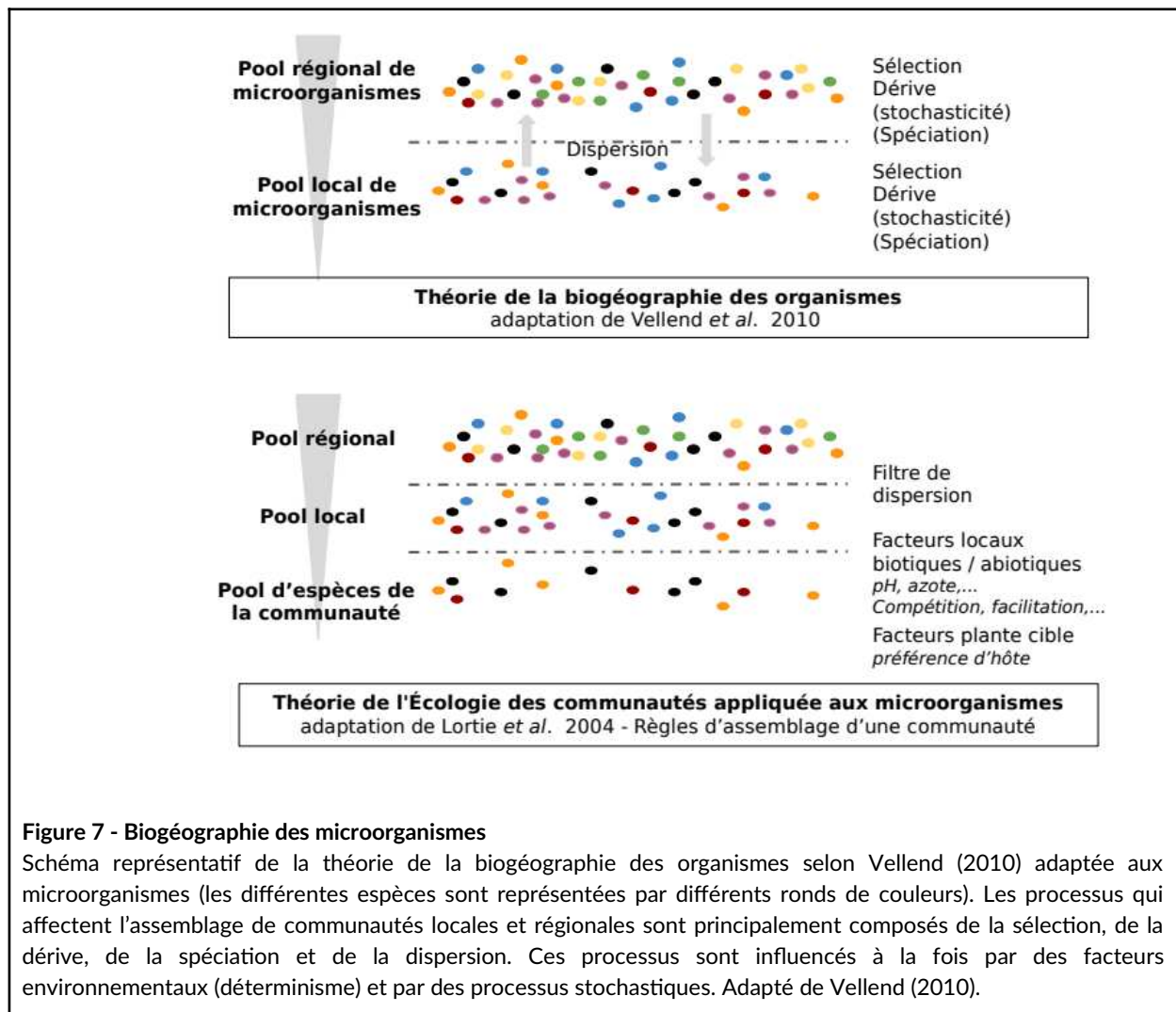
L'assemblage des communautés est décrit comme sous la contrainte d'une succession de filtres limitants (processus déterministes et stochastiques), qui modèlent une communauté locale à partir d'un pool régional d'espèces (filtres permissifs ou non d'espèces particulières) (Lortie *et al.* 2004) (Figure 7). Du pool régional au pool local d'espèces, ces filtres sont principalement : la dispersion (suppression des espèces selon leur capacité à disperser), les filtres abiotiques tels que les conditions physico-chimiques de l'environnement (suppression des espèces non adaptées à des conditions particulières de température, d'humidité ou de pH par exemple) et les filtres biotiques tels que les interactions entre espèces présentes dans un habitat (Lortie *et al.* 2004) (Figure 7). Ainsi, l'ensemble de ces filtres structure l'assemblage des communautés d'un habitat spécifique (conditions biotiques et abiotiques particulières) correspondant à une niche écologique (concept de niche de Hutchinson 1957).

De plus, l'étude de l'assemblage des espèces entre elles (métacommunauté, Leibold *et al.* 2004) a montré que un set de plusieurs communautés pouvaient se connecter essentiellement par dispersion. Il est désormais communément admis que quatre processus principaux régissent l'écologie des métacommunautés: sélection, dérive, spéciation et dispersion (Vellend 2010, Leibold *et al.* 2004) (Figure 7). Ces quatre processus sont influencés à la fois par des facteurs environnementaux (sélection déterministe) et par des processus stochastiques (Vellend 2010, 2016).

Les schémas biogéographiques et le corpus de connaissances, de concepts théoriques et de résultats empiriques qui y sont associés ont été principalement développés pour les macroorganismes. La transposition de ces connaissances aux microorganismes est d'une importance fondamentale puisque les microorganismes représentent de loin le réservoir de biodiversité le plus important sur terre (p.ex. Locey & Lennon 2016). Pendant longtemps, le postulat de Baas Becking (1934) selon laquelle "*tout est partout et l'environnement sélectionne*" a conduit à l'idée que les processus régissant la différenciation des communautés microbiennes étaient uniquement une conséquence de la sélection, avec comme idées sous-jacentes, une capacité de dispersion illimitée des microorganismes et l'absence de dérives stochastiques de ces communautés ainsi que l'absence de processus évolutifs conduisant par exemple à des phénomènes de spéciation (émergence de nouvelles espèces). Cependant, un certain nombre d'études a pu mettre en évidence des relations de "distance-décroissance" ("*distance-decay*" : déclin de la similarité microbienne à mesure que la distance spatiale augmente) parmi les assemblages de communautés de microorganismes, suggérant que, outre une différenciation en fonction de l'emplacement géographique, la variabilité dans ces assemblages est corrélée à la distance spatiale (Finkel *et al.* 2012; Hanson *et al.* 2012; Nemergut *et al.* 2013; Zinger, Boetius & Ramette 2014; Miura *et al.* 2017). Le concept de biogéographie des microorganismes a donc été proposé (Martiny *et al.* 2006).

## Introduction générale

Depuis, l'analyse et la détection des modèles biogéographiques pour les microorganismes se sont amplement développées. De plus en plus d'études montrent que les microorganismes varient en termes d'abondance, de diversité et de distribution, à de multiples échelles taxonomiques et spatiales, ce qui met en évidence le rôle des modèles géospatiaux dans différents types d'habitats (p.ex. habitats naturels, agroécosystèmes) (Gibbons *et al.* 2013; Peiffer *et al.* 2013; Bokulich *et al.* 2014; Morrison-Whittle and Goddard 2015; Bahram *et al.* 2018). Ces découvertes renforcent l'idée de liens étroits entre l'assemblage des communautés microbiennes et les facteurs locaux environnementaux.



**Figure 7 - Biogéographie des microorganismes**

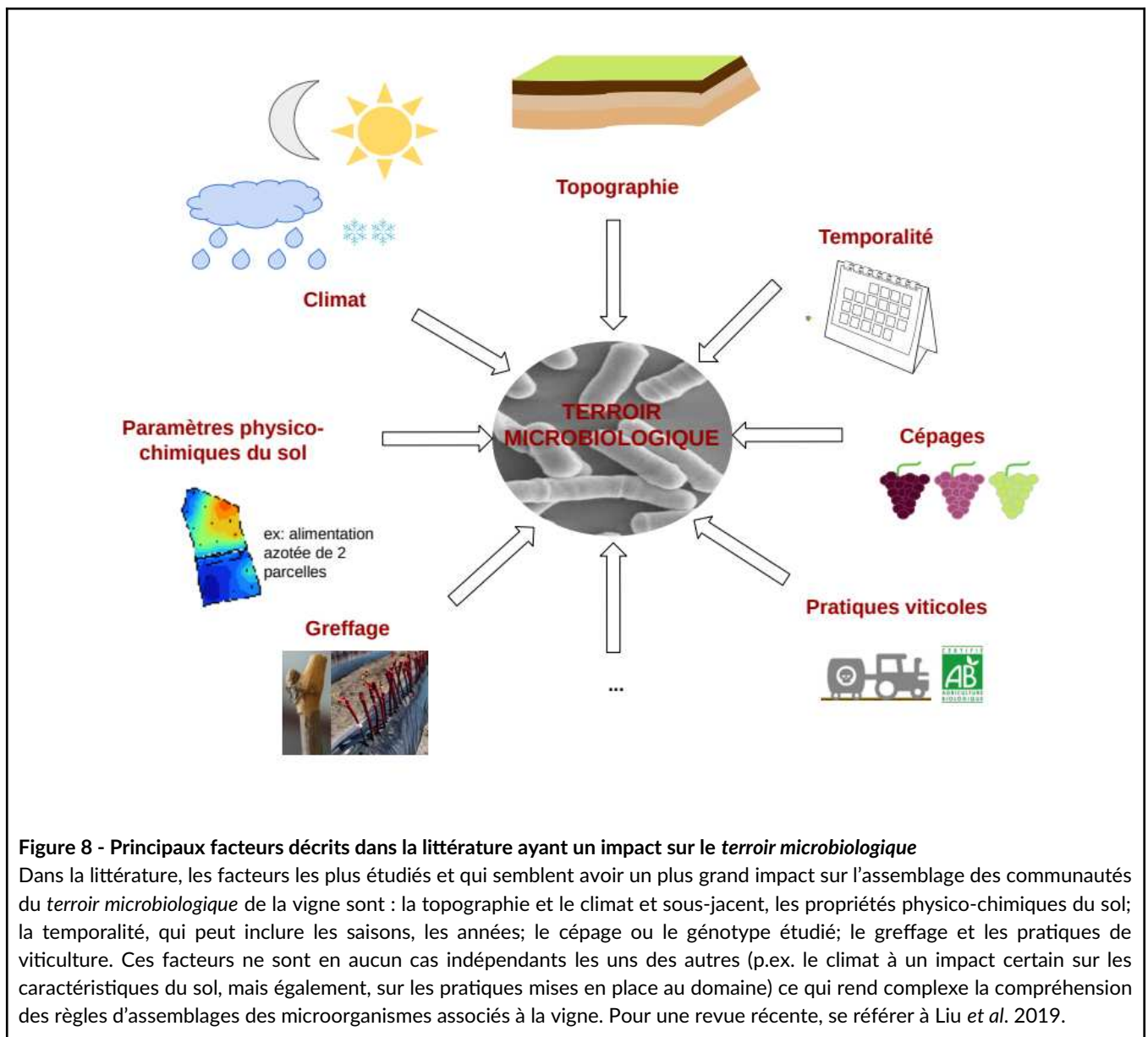
Schéma représentatif de la théorie de la biogéographie des organismes selon Vellend (2010) adaptée aux microorganismes (les différentes espèces sont représentées par différents ronds de couleurs). Les processus qui affectent l'assemblage de communautés locales et régionales sont principalement composés de la sélection, de la dérive, de la spéciation et de la dispersion. Ces processus sont influencés à la fois par des facteurs environnementaux (déterminisme) et par des processus stochastiques. Adapté de Vellend (2010).

### iii. Assemblages microbiens et principaux facteurs

Partout dans le monde, les chercheurs tentent de mettre en lumière les facteurs clés qui impactent l'assemblage des communautés du *terroir microbiologique* (du champ aux cuves de fermentation) et donc la biogéographie des microorganismes associés à la vigne. Les études montrent l'influence de multiples facteurs abiotiques et biotiques sur ces patrons biogéographiques, tels que le climat et la

## Introduction générale

topographie, les propriétés physico-chimiques du sol, l'enherbement et les pratiques viticoles (Figure 8). Pour une revue récente, se référer à Liu *et al.* (2019)



## Paramètres du sol

Parmi les facteurs locaux abiotiques modelant le terroir microbiologique de la vigne, la plupart des études met en avant le rôle fondamental des propriétés physico-chimiques du sol caractéristiques d'une région et même d'un vignoble donné. Par exemple, Zarraonaindia et ses collègues (2015) ont analysé la dynamique spatiale et temporelle des bactéries associées aux vignes de Merlot, et ont révélé des différences significatives de composition entre les organes de la plante (sol rhizosphérique, racine, feuille, fleur, raisin) et le sol (Zarraonaindia *et al.* 2015). En particulier, cette étude a montré un fort impact du pH et du ratio C/N (carbone/azote) sur la structuration des communautés bactériennes du sol et



## Introduction générale

des racines ainsi qu'un effet important de l'humidité et de la température du sol sur la composition bactérienne des feuilles et des grappes (Zarraonaindia *et al.* 2015). Burns et ses collègues (2015) ont montré que la structuration des communautés bactériennes du sol était dépendante des propriétés du sol, de la localisation des vignobles analysés et des caractéristiques géographiques associées (Burns *et al.* 2015). Ces auteurs suggèrent également que les distinctions observées entre régions viticoles proviennent principalement des différences de climat et de topographie qui affectent les communautés microbiennes par le biais de leurs impacts sur les propriétés du sol (Burns *et al.* 2015). Le climat et ses variations annuelles et inter-annuelles jouent donc également un rôle central dans la structure des communautés microbiennes. Par exemple, Bokulich et ses collègues (2014) ont montré que le climat (précipitations, température) d'une région donnée avait un impact sur la diversité microbienne des grappes et du moût mais que les distinctions régionales semblaient être faiblement affectées par le millésime (p.ex. température annuelle maximale, moyenne, minimale) (Bokulich *et al.* 2014). Récemment, Steenwerth et ses collègues (2021) ont montré un effet de la quantité de précipitations et de la température journalière, durant la phase de croissance de la vigne, sur la structuration des communautés bactériennes et fongiques du moût de grappes récolté dans différents vignobles entre régions (Steenwerth *et al.* 2021). Cependant, en ce qui concerne les communautés fongiques, cette étude a montré que la dissimilarité observée semble être bien plus expliquée par la distance entre les vignobles ("*distance decay*"), observation d'autant plus vraie que les espèces fongiques ont généralement des distances de dispersion limitées, souvent influencées par la taille des spores (Steenwerth *et al.* 2021). De plus, une autre étude analysant 22 vignobles d'une région viticole d'Afrique du Sud a montré que, outre l'effet certain de la topographie et des paramètres du sol, le climat a un impact sur les communautés bactériennes du sol (Zhou *et al.* 2021). Bien que les taxa dominants semblent rester constants au niveau régional, leurs résultats indiquent que les régions plus fraîches et plus humides présentent une diversité microbienne du sol relativement plus faible, et un rapport plus élevé d'espèces dominantes en comparaison aux sites plus chauds et secs (Zhou *et al.* 2021).

## Climat et temporalité

Derrière ces aspects de facteurs locaux abiotiques, dont le climat, se trouve également la notion de variabilité intra- et inter-annuelle du microbiote, c'est-à-dire, la dynamique temporelle des microorganismes. Ce dernier point est un aspect fondamental dans la compréhension des règles d'assemblage des microorganismes. Plusieurs auteurs travaillant sur différents modèles biologiques ont mis en évidence plusieurs mécanismes associés aux fluctuations temporelles du microbiote des plantes. Ces principaux mécanismes sont, d'une part, le stade de développement de la plante et d'autre part, les pressions environnementales. Les variations liées au stade de développement de la plante peuvent être expliquées par des modifications dans les besoins de la plante (nutrition minérale, hydrique par exemple) ou par des modifications dans l'architecture racinaire durant sa croissance (Mougel *et al.* 2006; Chaparro, Badri & Vivanco 2014; Copeland *et al.* 2015; Saleem *et al.* 2018; Grady *et al.* 2019; Chesneau

## Introduction générale

*et al.* 2020; Iannucci *et al.* 2021). Les variations temporelles liées aux pressions environnementales sont principalement expliquées par des conditions climatiques contrastées, tout au long de l'année et entre différentes années, entraînant certaines modifications des paramètres du sol (disponibilité en eau, pH, changements du ratio C/N par exemple) (p.ex. Jumpponen & Jones 2010). La variabilité temporelle des microorganismes a été encore peu analysée dans la littérature scientifique associée au *terroir microbiologique* de la vigne. Canfora et ses collègues (2018) ont montré que la diversité des bactéries du sol dépendait de l'année considérée et que ces variations observées étaient en partie expliquées par les conditions climatiques (Canfora *et al.* 2018). Berlanas et ses collègues (2019) ont également montré que l'année ainsi que la date d'échantillonnage affectent fortement les richesses bactériennes et fongiques rhizosphériques dans deux vignobles analysés (Berlanas *et al.* 2019). Récemment, Liu et Howell ont étudié les changements intra-annuels du microbiote fongique de différents organes de la vigne et ont mis en évidence des effets du bio-comportement analysé et des stades de développement de la vigne dans la structuration du mycobiote et sur la diversité fongique (Liu & Howell 2020). Les auteures ont démontré un lien entre les conditions météorologiques et les modifications de la composition fongique et ont constaté des changements importants dans la composition et la diversité du mycobiote, en particulier au stade de la véraison (Liu & Howell 2020). Par ailleurs, une autre étude a montré que la richesse et la composition des communautés bactériennes du sol étaient dépendantes d'une combinaison de facteurs (cépage, stade de développement, conditions abiotiques) plus que d'un seul facteur indépendant et en particulier, ils ont montré un effet important du stade de développement de la vigne pour chaque cépage considéré individuellement (stades testés : la floraison, la véraison et la récolte) (Vink *et al.* 2021).

### Échelle spatiale considérée

Il est important de noter que la plupart des études a analysé le *terroir microbiologique* sur de larges échelles (entre continents, entre pays et entre régions). Pourtant, la notion d'échelle géographique est cruciale dans l'analyse des assemblages microbiens (biogéographie microbienne). En effet, les caractéristiques géographiques et climatiques peuvent fortement varier si l'on considère de grandes échelles alors que à des échelles géographiques plus petites (échelle du vignoble par exemple), ces différences peuvent ne pas être apparentes. Il est donc légitime de se demander si à l'échelle d'un domaine, dans lequel les facteurs déterminants dans l'assemblage des communautés microbiennes (la roche mère, la topographie, le climat, les pratiques) sont supposés être sensiblement homogènes, il existe des patrons hétérogènes de structuration des communautés de microorganismes. L'hétérogénéité supposée peut notamment être liée aux modifications de l'environnement local et/ou à la capacité limitée de dispersion de certains taxa dans l'espace, et ce, même à une petite échelle géographique (vignoble). Une étude récente a fourni la première preuve de l'existence de variations structurelles du microbiote de la vigne en fonction des propriétés locales du sol au sein d'un vignoble dans lequel les pratiques de viticulture sont similaires et le nombre de génotypes de vigne est très limité (Liang *et al.* 2019). Ils ont montré que les communautés microbiennes du sol à proximité des plants de vigne étaient fortement

## Introduction générale

hétérogènes et que cette hétérogénéité était en partie expliquée par les caractéristiques du sol (Liang *et al.* 2019). Par ailleurs, Knight et ses collègues (2020), bien que travaillant sur 4 vignobles différents, ont également montré, à petite échelle (2 km de rayon), l'existence de différents patrons biogéographiques entre les communautés de champignons du sol dus à l'hétérogénéité environnementale locale (Knight, Karon & Goddard 2020). Afin de mieux définir le *terroir microbiologique*, et plus généralement la dynamique spatiale et temporelle des microorganismes, mais aussi, afin d'aider les viticulteurs dans la compréhension et la sublimation de leur *terroir*, il est donc extrêmement important de comprendre les règles d'assemblage du microbiote de la vigne sur de petites échelles, du fait de l'existence de variations des facteurs locaux environnementaux.

### iv. Autres facteurs : pratiques viticoles

D'autres facteurs impactant les assemblages microbiens sont également bien documentés dans la littérature scientifique. Il s'agit, entre autres, des pratiques agronomiques (produits phytosanitaires ou pratique biologique / biodynamique, labour, enherbement par exemple), du greffage des plants cultivés ou encore du génotype des plantes ou du cépage (Figure 8). La vigne est particulièrement sujette à une gestion intensive par l'homme, comprenant l'utilisation d'amendements, de fongicides, de pesticides, ainsi qu'un important travail du sol et une monoculture exclusive. Les interventions culturales influencent sur les paramètres du sol, comme par exemple, la teneur en matière organique, la teneur en azote, et impacte, de ce fait, la richesse et la composition des microorganismes du sol dans les vignobles (Burns *et al.* 2016; Morrison-Whittle, Lee & Goddard 2017, voir également la synthèse bibliographique de Liu *et al.* 2019).

### Travail du sol

Dans leur étude, Burns et ses collègues (2016) ont particulièrement mis en évidence, l'importance de l'enherbement et du type de mélanges de plantes appliqué dans la structuration des communautés bactériennes de différents types de vignobles (conventionnel/biologique/biodynamique) (Burns *et al.* 2016). Une étude a par ailleurs montré que la composition des espèces fongiques, et notamment des champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF), variait sensiblement selon l'enherbement appliqué comme couvert végétal hivernal (Cloutier *et al.* 2020). Ils ont notamment indiqué que les mélanges de différentes variétés de plantes (pois, trèfle, seigle additionnés ou non de colza, coton et radis) étaient plus favorables aux champignons mycorhiziens par rapport à l'utilisation de monocultures de Brassicaceae (Cloutier *et al.* 2020). Martínez-García et ses collègues (2018) ont également démontré que l'enherbement et les différentes espèces de plantes utilisées à la vigne avaient un fort impact sur les communautés microbiennes ainsi que sur leurs activités (Martínez-García *et al.* 2018). Dans cette étude, les auteurs ajoutent que, plus que la diversification des espèces utilisées, l'utilisation durant plusieurs années d'un enherbement avait un très fort impact sur l'identité des communautés microbiennes (Martínez-García *et al.* 2018). Des travaux expérimentaux fondateurs ont

## Introduction générale

dévoilé que la diversité et la productivité d'un écosystème étaient positivement liées (Tilman 2001; Tilman *et al.* 2002). Une augmentation de diversité dans un écosystème semble donc être associée à une amélioration vraisemblable de sa durabilité (Tilman *et al.* 2017). Ainsi, dans le cas des microorganismes, l'augmentation de la diversité végétale apportée par l'enherbement permet, entre autres, d'augmenter le pool local de microorganismes recrutables par la plante cible afin de pallier les modifications de l'environnement et/ou les attaques de pathogènes. Pour plus de détails sur l'enherbement et la diversité microbienne, voir la synthèse bibliographique de Vukicevich et ses collègues (2016) (Vukicevich *et al.* 2016).

Étroitement associé à l'enherbement, le labour a également fait l'objet d'études sur l'impact que cette pratique peut avoir sur les communautés microbiennes à cause de la perturbation directe du sol. Par exemple, le travail du sol peut conduire à des variations du contenu en matière organique et des modifications de la structure du sol (taille des agrégats de sol, composition et stabilité de ces agrégats), impactant ainsi la disponibilité des nutriments (Calderón *et al.* 2001; Lee *et al.* 2009) et la capacité de rétention en eau. Le labour peut également impacter directement le développement des microorganismes et notamment les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) qui développent des réseaux d'hyphes de grandes tailles à travers le sol (Trouvelot *et al.* 2015). Likar et ses collègues (2017) ont par ailleurs montré que la diversité microbienne du sol variait considérablement entre les vignobles soumis à différents modes de gestion (conventionnelle/écologique) et que le travail du sol avait un effet important sur les communautés bactériennes (Likar *et al.* 2017). Récemment, une étude a montré que la structuration des communautés bactériennes était fortement impactée par un effet combiné de facteurs abiotique et biotique de la vigne (stade de développement et cépage) associé à différents types de travail du sol (d'un labour intensif à l'absence de travail du sol) et à la mise en place ou non d'irrigation des champs (Vink *et al.* 2021).

## Intrants

Le type de viticulture et le type de produits appliqués sur les vignes impactent profondément les communautés de microorganismes. En viticulture conventionnelle, l'usage de fertilisants minéraux conduit généralement à une acidification du sol et impacte souvent de façon négative le compartiment microbien (Muñoz-Leoz *et al.* 2012), en modifiant les assemblages de microorganismes par la pression de sélection induite par la concentration en ammonium, nitrate, phosphate apportée au sol (Hijri *et al.* 2006; Guo *et al.* 2020). L'usage de fongicides et de pesticides modifie également les assemblages microbiens (Gilbert, van der Lelie & Zarraonaindia 2014; Perazzolli *et al.* 2014; Miura *et al.* 2017; Chou *et al.* 2018) et peuvent agir directement sur les communautés fongiques naturelles présentes dans le sol ou les plantes (Trouvelot *et al.* 2015). Notamment, l'étude de Radić et ses collègues (2014) a montré une plus forte colonisation des racines par les champignons endophytes, une augmentation de la diversité et du nombre de spores de Gloméromycètes dans les vignobles en conduite biologique (Radić *et al.* 2014).

En système biologique, la diminution et/ou l'arrêt de l'utilisation des produits phytosanitaires au

## Introduction générale

profit de mélanges à base de cuivre ou de soufre semble bénéficier aux communautés microbiennes (Vega-Avila *et al.* 2015; Hendgen *et al.* 2018). En effet, les produits systémiques et/ou fongicides utilisés en pratique conventionnelle pour lutter contre certains pathogènes sont suspectés d'avoir un effet collatéral sur l'ensemble de la microflore non ciblée du sol et de la plante. Cependant, les études montrent en parallèle que les produits alternatifs, bien que leurs effets semblent être moins délétères pour les microorganismes, impactent tout de même la structuration des communautés de bactéries et de champignons (p.ex. Hendgen *et al.* 2018). De plus, l'addition de compost ou de fumier dans les systèmes biologiques ou biodynamiques conduit à une augmentation de richesse, de diversité et d'activité microbienne associée à des modifications d'assemblage du compartiment microbien (Perazzolli *et al.* 2014; Calleja-Cervantes *et al.* 2015; Longa *et al.* 2017).

## Sélection variétale

Enfin, et même si encore bien d'autres facteurs peuvent influencer les communautés microbiennes du sol et des bio-compartiments de la vigne, des auteurs ont montré que le génotype de la vigne, le cépage utilisé ainsi que le greffage pouvaient profondément moduler le microbiote. Des études ont observé des différences dans l'assemblage des communautés bactériennes des grappes de raisin selon le cépage considéré (Bokulich *et al.* 2014; Mezzasalma *et al.* 2018). Les auteurs ont mis principalement en avant des différences de surfaces entre les grappes "rouges" et "blanches" (épaisseur de la peau par exemple), ainsi que des différences de concentration en anthocyanes (propriété anti-microbienne) comme facteurs pouvant expliquer ces variations de composition du microbiote des baies (Bokulich *et al.* 2014; Mezzasalma *et al.* 2018). Cependant, les auteurs concluent avec précaution leurs études et soulignent que la localisation géographique semble impacter plus profondément les communautés (Bokulich *et al.* 2014; Mezzasalma *et al.* 2018). Récemment, une autre étude a montré que les communautés bactériennes de la rhizosphère étaient fortement différenciées entre les trois cépages analysés (Chardonnay et Xynisteri (grappes "blanches"), Maratheftiko (grappes "rouges")) (Vink *et al.* 2021). Berlanas et ses collègues (2019) ont également mis en avant, l'effet du génotype du porte-greffe sur la composition des communautés de bactéries et de champignons de la rhizosphère associés aux pieds de vigne adultes (Berlanas *et al.* 2019). Ils identifient notamment certains taxa clés associés aux différents génotypes de porte-greffes et montrent que les Firmicutes et les Acidobactéries ainsi que les Ascomycètes et les Basidiomycètes représentent les phyla majoritaires impliqués dans la différenciation entre génotypes des microorganismes rhizosphériques (Berlanas *et al.* 2019). Précédemment, Marasco et ses collègues (2018) avaient également montré un effet important du génotype du porte-greffe et du greffage sur la structuration des bactéries du sol rhizosphérique et des racines de vigne (Marasco *et al.* 2018). Le génotype du porte-greffe semble donc jouer un rôle décisif sur la structuration et le recrutement des communautés microbiennes endophytes des plants de vigne et sur le microbiote de la rhizosphère (D'Amico *et al.* 2018; Marasco *et al.* 2018).

#### IV. Objectifs de la thèse

Cette thèse est organisée autour de deux objectifs principaux : évaluer la légitimité du concept d'holobionte et étoffer les connaissances autour des dynamiques spatiales et temporelles qui structurent les communautés microbiennes, c'est-à-dire mieux comprendre l'hétérogénéité du microbiote des plantes généralement observée. Ce travail ambitieux est envisagé sur la vigne qui a l'énorme avantage de contenir peu de variabilité génétique et donc l'effet génotype est assez facile à maîtriser, à tester et à dissocier des autres effets. Cette thèse est accueillie par des professionnels de la vigne en agriculture biologique et biodynamique : elle constitue une étape dans l'acquisition de connaissances pour répondre à un questionnement sur la santé des plantes et la qualité des vins en termes de distribution et évolution des communautés microbiennes.

Pour ce faire, nous avons mis en place deux principaux plans d'expériences qui sont détaillés dans le premier chapitre (Chapitre 1 "Eléments de méthodologie"). Plus précisément, les objectifs de cette thèse sont les suivants :

- Sur la base des connaissances d'héritabilité du microbiote, nous avons cherché à montrer l'existence d'un recrutement actif de microorganismes par des plantes chimériques greffées afin de tester la légitimité du concept d'holobionte. Dans le cas des plantes, puisqu'une grande majorité des microorganismes constitutifs du microbiote est acquise horizontalement, une question importante est donc de savoir si ces microorganismes colonisent leur hôte de façon aléatoire ou sous pression de forces déterministes façonnées par la part génétique de l'hôte (Chapitre 2).
- Sur la base du corpus de connaissances autour des principaux facteurs qui influencent le microbiote des plantes, nous avons cherché à comprendre les dynamiques spatiales et temporelles des communautés microbiennes (Chapitres 3.1 et 3.2). Dans le cas de la vigne, la plupart des études a analysé l'impact de ces facteurs à de larges échelles géographiques et se sont principalement focalisées sur le sol ou le sol rhizosphérique. Dans cette thèse, nous avons choisi de travailler à une petite échelle géographique (hétérogénéité locale d'un domaine viticole) et sur l'endosphère racinaire de la vigne du fait de son grand intérêt dans de nombreux processus écologiques détaillés dans l'introduction générale de cette thèse.
  - ❖ Nous avons donc cherché à déterminer les principaux facteurs (abiotiques et spécifiques à la vigne) déterminant l'assemblage, la richesse et la diversité des communautés microbiennes (bactéries et champignons) de l'endosphère racinaire dans un vignoble. Particulièrement, nous avons testé les hypothèses d'assemblages des communautés en fonction de l'hétérogénéité locale des conditions abiotiques et biotiques (Chapitre 3.1)

## *Introduction générale*

- ❖ Nous avons cherché à comprendre la dynamique temporelle des assemblages microbiens (bactéries et champignons) dans un vignoble au cours du cycle de croissance annuel (sur 2 années) à deux stades clés pour la vigne : à la floraison et à la maturité des baies (avant vendange). Particulièrement, nous avons testé les hypothèses d'une variabilité intra-annuelle fortement déterminante dans la structuration des communautés et l'existence d'un recrutement déterminé des communautés constitutives de l'endosphère racinaire (Chapitre 3.2).



# CHAPITRE1 - ÉLÉMENTS DE MÉTHODOLOGIE

## A. Site d'étude et modèle biologique

I- Château Palmer: historique, domaine, pratiques viticoles et engagement

II- La vigne

## B. Greffage et plantes chimériques

## C. Caractérisation du *terroir microbiologique* de la vigne

## D. Conditionnement des racines et biologie moléculaire

## E. Analyses bioinformatiques

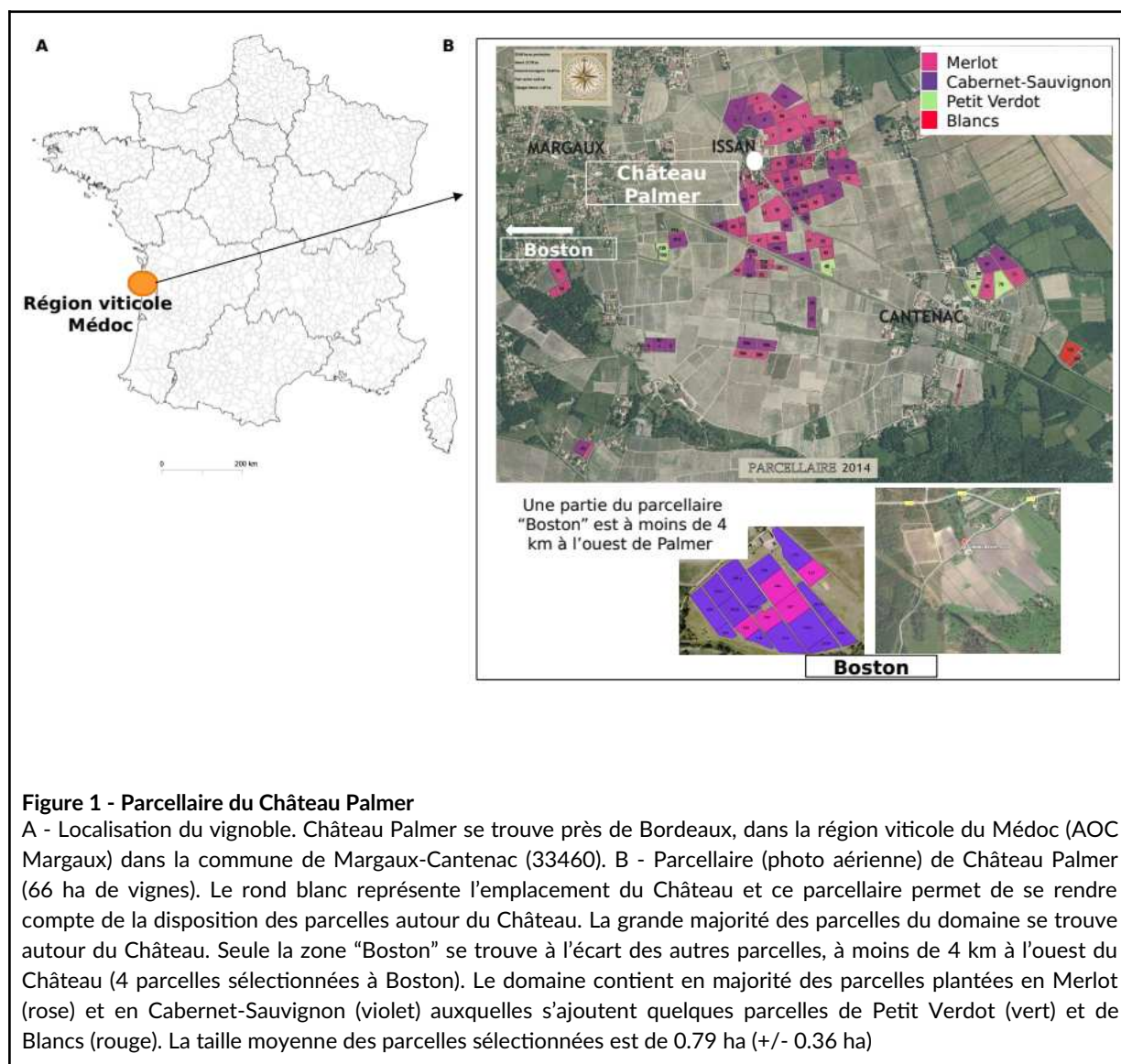




## A. Site d'étude et modèle biologique

### I. Château Palmer : historique, domaine, pratiques viticoles et engagement

Comme expliqué dans l'avant-propos de cette thèse, la majeure partie du terrain de thèse et des échantillonnages s'est déroulée au sein du vignoble de Château Palmer (plan d'échantillonnage des chapitres 3.1 et 3.2, voir Figure 1 et partie C). Déjà au 18<sup>ème</sup> siècle, le château "Domaine de Gasq", propriété de Madame de Gasq, était un domaine viticole exploité et particulièrement reconnu pour la qualité de ses vins. Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, ce domaine est vendu à Charles Palmer (colonel britannique) et change de nom pour devenir Château Palmer. C'est à cette même époque que le domaine sera largement développé (82 hectares de vignes) pour atteindre le rang de 3<sup>ème</sup> grand cru classé dans le fameux classement de 1855. Le domaine passe entre différentes mains de propriétaires avant d'être racheté en 1938 par l'union de quatre familles de négociants bordelais, deux des quatre familles étant toujours propriétaires à ce jour (Sichel et Mälher-Besse). En 2004, Thomas Duroux prend les rênes du domaine en tant que directeur général et est secondé, depuis 2007, par Sabrina Pernet, directrice technique. Château Palmer emploie actuellement 65 personnes dont plus de la moitié travaille à la vigne. Le domaine viticole compte à ce jour 66 hectares de production et 32 hectares de prairie. Dans la figure 1, le rond jaune représente l'emplacement du Château. La grande majorité des parcelles du domaine se trouve autour du Château. Seule la zone "Boston" se trouve à l'écart des autres parcelles, à moins de 4 km à l'ouest du Château (4 parcelles sélectionnées à Boston dans le plan d'échantillonnage). Le domaine contient en majorité des parcelles plantées en Cabernet-Sauvignon (33 hectares - violet) et en Merlot (28,5 hectares - rose) auxquelles s'ajoutent quelques parcelles de Petit Verdot (vert) et de Blancs (rouge) (Figure 1). Une des spécificités de Château Palmer est la forte proportion de Merlot dans ses assemblages en comparaison de ses voisins de l'appellation. Depuis plus de 10 ans, Château Palmer s'attache à allouer les moyens humains et financiers nécessaires à la transition vers une viticulture plus responsable en favorisant la recherche appliquée en interne. La remise en question des pratiques y est permanente par une réelle volonté de changer les habitudes ou du moins de les affiner, afin de promouvoir la viticulture de demain, respectueuse des différents écosystèmes qui gravitent autour de la vigne (Thomas Duroux, lors d'une discussion informelle me dit : "*je veux juste que le vivant redevienne vivant dans les vignobles*").



Dès 2008, un tournant important se produit lorsque le domaine entame des essais en biodynamie. Après plusieurs années d'expérimentations et d'observations, l'ensemble du domaine est converti en biodynamie et en 2013 le domaine est certifié DEMETER. En plus de la biodynamie, le domaine cherche à étendre ses pratiques agricoles pour plus de cohérence, de diversité biologique et d'autosuffisance. Ainsi, Château Palmer a fait le choix de travailler avec 10 bovins, 5 caprins et 200 ovins qui paissent dans les parcelles durant l'hiver (période de dormance de la vigne). Pour permettre cette démarche, le domaine a créé des partenariats avec les éleveurs ovins de la région. L'utilisation d'un troupeau animal doit aussi permettre à terme, au domaine, d'être autonome quant à la matière organique apportée à la vigne, une partie du fumier étant pour l'instant achetée à une ferme biologique voisine. Par ailleurs, le domaine cherche à augmenter la diversité végétale dans une monoculture souvent pauvre en biodiversité. Le domaine a donc choisi de travailler selon les principes de l'agroforesterie, en plantant des haies mais également des herbes aromatiques en bout de rangs de vigne

ou encore des arbres fruitiers en milieu de parcelle. Un projet de jardin/potager en permaculture est également en cours de développement. Ce dernier permettrait de fournir certaines denrées alimentaires au cuisinier et aux employés du château. Au chai, l'équipe cherche également à raisonner la vinification. Ainsi, ils utilisent principalement des levures indigènes de fonds de cuves pour les fermentations, les intrants sont grandement limités et le sulfitage à l'encuvage n'est plus réalisé depuis 2014. De plus, grâce à un dispositif expérimental de 10 mini cuves de 9 hectolitres, des essais de réduction ou de suppression d'azote organique et de sulfites en cours d'élevage et lors de la mise en bouteilles sont menés depuis plusieurs années.

## II. La vigne

La vigne cultivée (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) est l'une des 79 espèces de plantes grimpantes du genre *Vitis* appartenant à la famille des plantes à fleurs Vitaceae (Kew 2013; Wen *et al.* 2013; Zhang, Wen and Zimmer 2015). La vigne cultivée pour la production de vin est nommée *Vitis vinifera* L.. Elle est originaire d'Eurasie et représente la vigne la plus cultivée à travers le monde. C'est une plante ligneuse, pérenne. Tout au long de l'histoire de la domestication de la vigne, les humains ont sélectionné des caractères morphologiques et physiologiques favorables à sa culture, ainsi que des caractères organoleptiques pour sa consommation. La vigne sauvage ("lambrusques spontanées", "vraies") est à l'origine une liane de sous-bois de la famille des Vitaceae qui s'accroche aux arbres par des vrilles afin de parvenir à capter la lumière nécessaire à sa croissance (communication personnelle, Marc-André Selosse). Il est intéressant de noter que la production actuelle des vignes est faite dans des espaces non ombragés, en plein soleil, afin d'intensifier la production de tanins (communication personnelle, Marc-André Selosse).

Comme expliqué précédemment (Introduction générale), la vigne cultivée est issue majoritairement de greffage entre greffons et porte-greffe. Il existe un grand nombre de porte-greffe et de greffons issus principalement de croisements végétaux. La majorité des porte-greffes utilisés en France sont : 101-14MG, 3309C, SO4, 101R et le choix de ce porte-greffe dépend du type de sol et des conditions climatiques de chacun des vignobles. Le type de greffons utilisé dépend, quant à lui, de la variété (cultivar, cépage) désirée et des habitudes du pépiniériste et du domaine. Les greffons sont obtenus principalement par multiplication clonale. Le site web "Plantgrape" regroupe un grand nombre de porte-greffes et greffons autorisés à la culture en France.

Durant un cycle annuel de croissance, plusieurs stades phénologiques de la vigne cultivée ont été identifiés et sont très bien documentés selon les sources (IFV, Institut Française de la Vigne et du Vin; INRAE). Les principaux stades de développement de la vigne sont le débourrement (sortie des bourgeons), la floraison (anthèse), la nouaison (phase initiale de formation des baies), la véraison (changement de couleur des baies) et la récolte (maturité) (Coombe 1992; Keller 2020). Le débourrement, début d'un nouveau cycle de croissance, commence avec l'apparition des feuilles. La

division cellulaire associée à la production d'auxine dans les bourgeons active la sortie et la croissance des petites pousses en utilisant les réserves nutritionnelles (hydrates de carbone) stockées au niveau des racines et du bois de la vigne lors de l'année précédente (Keller 2020). La floraison initie le début de la phase de reproduction (fécondation des stigmates par le pollen) durant laquelle les baies de raisin vont se former (fruits charnus contenant plusieurs pépins), c'est la nouaison (Coombe 1992; Keller 2020). Les jeunes baies nouvellement formées vont ensuite grossir durant quelques semaines et accumuler des acides organiques et peu de sucre à ce stade (Coombe 1992; Keller 2020). La véraison marque ensuite le début de la maturation des baies, période durant laquelle les baies changent de couleur (accumulation d'anthocyanes), se ramollissent (dégradation de la pectine et de la cellulose) et accumulent des sucres (glucose et fructose) (Coombe 1992). La forte proportion de sucre dans les baies en fait un terrain favorable à la croissance des microorganismes (Renouf, Claisse and Lonvaud-Funel 2005). La récolte des raisins a lieu une fois que la maturation finale des baies est atteinte et que les composés complexes sont formés dans les baies (sucres, acides et métabolites secondaires d'arômes et de saveurs) (Coombe 1992; Keller, 2020).

Selon les domaines, et de ce fait, selon les pratiques, la durée de vie d'une vigne au champ est variable. Les plants néo-formés et greffés sont dans un premier temps plantés à la pépinière (1 an) avant d'être envoyés aux domaines viticoles. Une fois plantée au domaine, il faut généralement 3 ans pour que la vigne produise des raisins (acclimatation au sol et aux contraintes abiotiques et croissance racinaire). Durant les 10 premières années, la vigne produit une importante quantité de raisins qui ne répondent généralement pas à la qualité exigée dans le cas d'un grand vin. Après 20 ans de plantation, la vigne est à son âge d'or. Elle produit une quantité moindre de raisins par pied mais d'une qualité organoleptique bien supérieure. Le terme de "vienne vigne" est usuellement utilisé pour des vignes âgées de plus de 40 ans pour des raisons commerciales. Ces "vieilles vignes" produisent des baies de grande qualité. Généralement, les plants sont arrachés entre 30 et 50 ans de vie en champ pour des raisons économiques mais cela dépend fortement des pratiques du domaine viticole considéré. Cependant, une vigne peut vivre bien plus longtemps que 50 ans et produire des raisins de grande qualité jusqu'à au moins 100 ans.

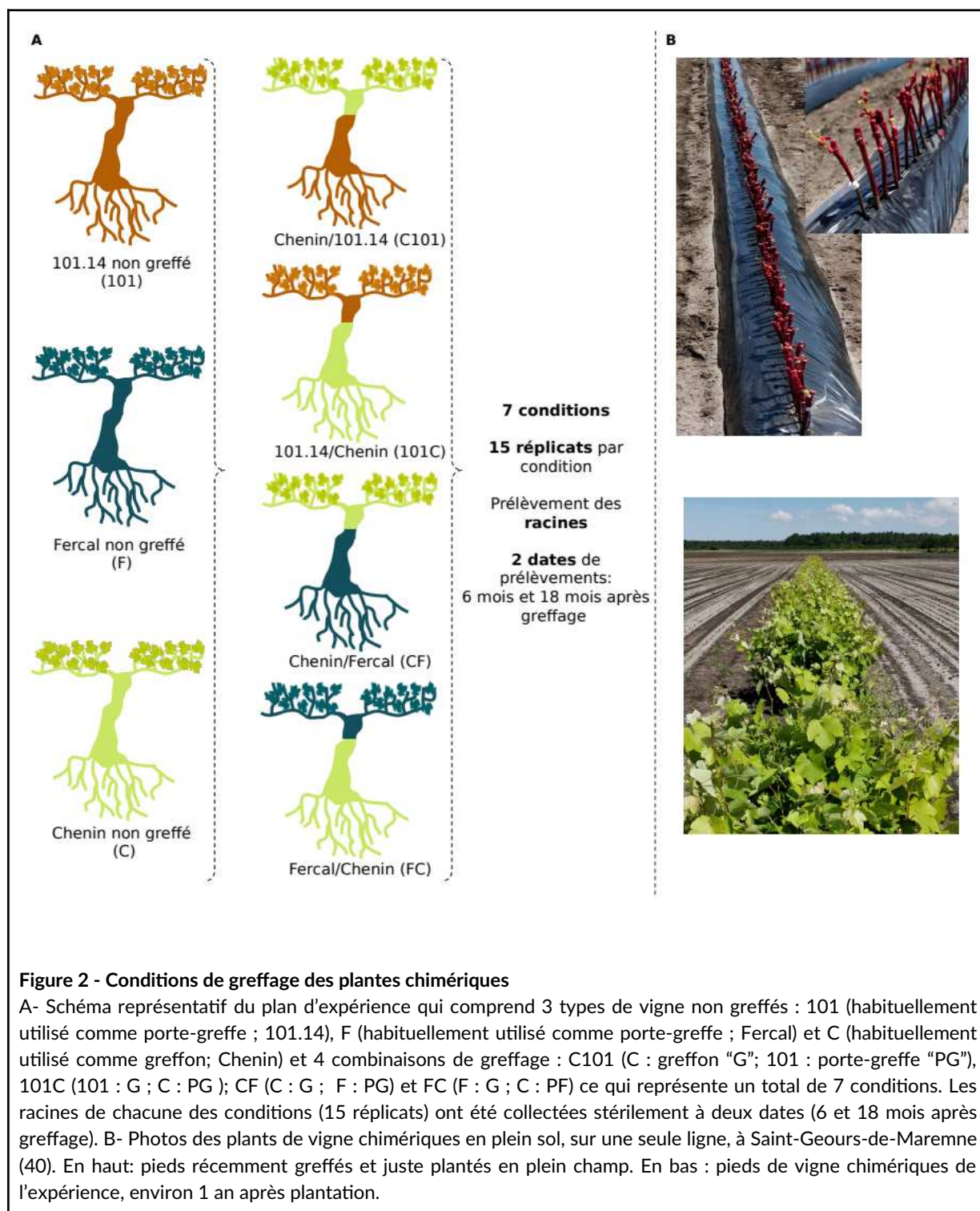
### **B. Greffage et plantes chimériques**

Le chapitre 2, où l'on cherche à tester la validité de la théorie de l'holobionte, repose sur un plan d'expérience étudiant plusieurs modèles d'étude dont la vigne. Cette expérience a été réalisée et coordonnée par le laboratoire ECOBIO et l'université de Nanjing. Pour le modèle d'étude qui nous concerne - la vigne - le développement des plantes chimériques à partir de plusieurs génotypes de vigne a été réalisé en collaboration avec la pépinière viticole de Salettes (Thibaud de Salettes et Isabelle Omon). L'autre modèle biologique étudié dans l'article du chapitre 2 (pastèque / calebasse ; watermelon / bottle-gourd) n'est pas détaillé dans ce chapitre de méthodologie.

## Chapitre 1 - Éléments de méthodologie

La pépinière de Salettes, qui a réalisé l'ensemble des greffages de plants de vigne, est localisée à Denguin (64) et travaille depuis plusieurs années avec Château Palmer. Cette pépinière a donc réalisé différents types de greffage de plants de vigne à partir de deux types de vignes (deux génotypes), habituellement utilisés uniquement comme porte-greffes : les porte-greffes 101.14 MG Millardet et de Grasset (101) (*Vitis rupestris* x *Vitis riparia*) et Fercal (F) (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* x *Vitis longii*) et un type de vigne habituellement utilisé uniquement en tant que greffon : le Chenin (C) (*Vitis vinifera*). Le plan d'expérience est détaillé ci-dessous (Figure 2A) et comprend 7 conditions de greffage au total : 101 non greffé, F non greffé, C non greffé, C101 (C : greffon ; 101 : porte-greffe), 101C (101 : greffon ; C : porte-greffe) ; CF (C : greffon ; F : porte-greffe) et FC (F : greffon ; C : porte-greffe). Les prélèvements racinaires ont eu lieu à 2 dates : à 6 mois (marquage des plants prélevés et maintien en sol) puis à 18 mois après greffage (arrachage des plants marqués à 6 mois et prélèvement des racines). Pour chacune des conditions et à chacune des deux dates, 15 réplicats ont été échantillonnés pour un total de 210 racines (Figure 2A).

Aucun traitement fongicide n'a été réalisé sur le matériel végétal avant greffage. Toutes les conditions de greffage ont été réalisées durant la même semaine du 15 avril 2019 à la pépinière (Denguin), stockées en salle de chauffe (stratification des greffes : formation du cal de greffe et l'enracinement du porte-greffe) jusqu'à la plantation en champ qui a eu lieu le 15 Mai 2019 à Saint-Geours-de-Maremne (40). Les plantes greffées ont été plantées sur un seul rang de plusieurs mètres de long afin de s'assurer de l'homogénéité des conditions environnementales (Figure 2B). Ce champ est caractérisé par un sol de type Luvisol (sol épais de plus de 50 cm, processus important de lessivage vertical des particules d'argile et de fer et accumulation de ces particules en profondeur).



### C. Caractérisation du terroir microbiologique de la vigne

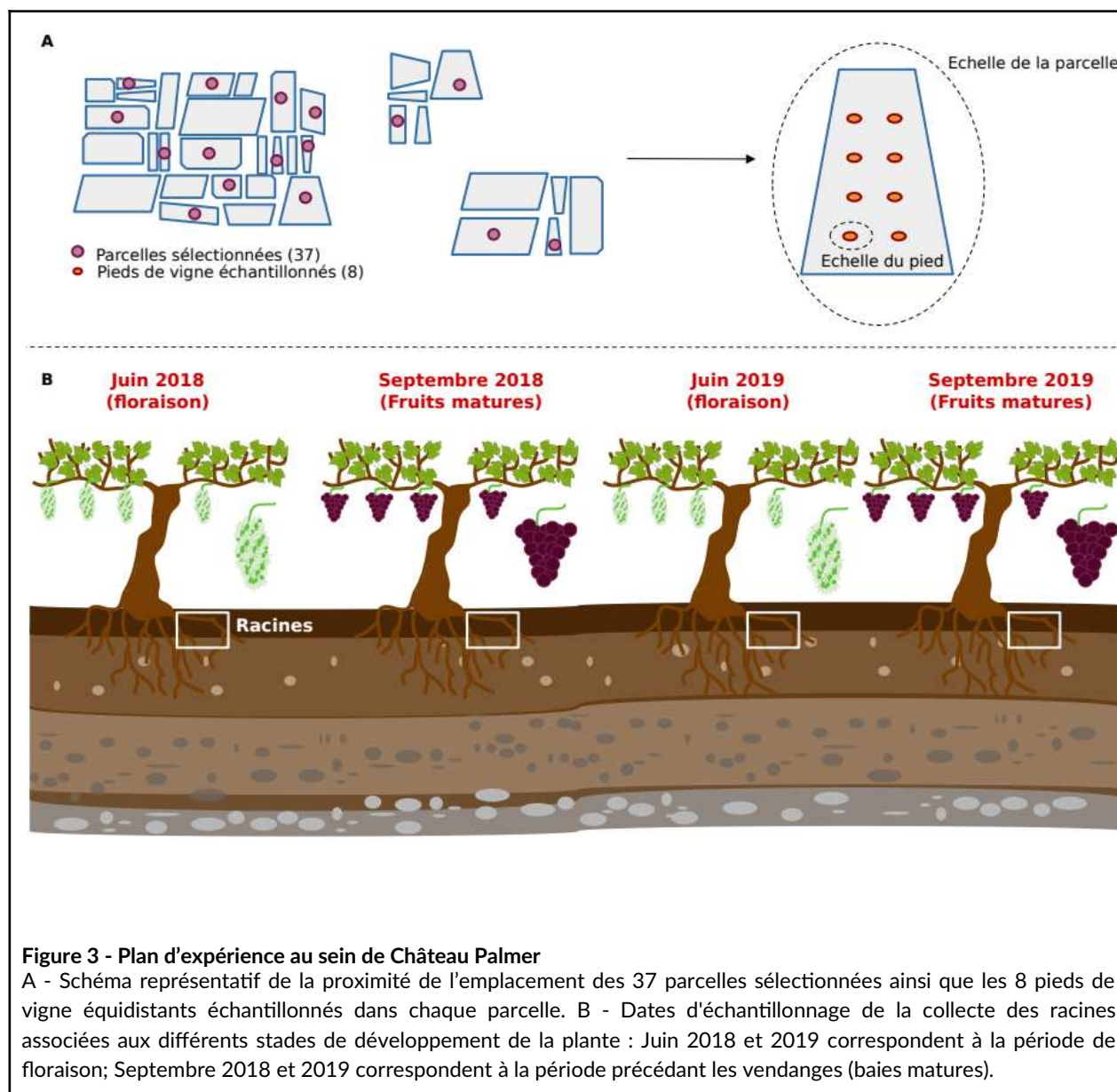
Les chapitres 3.1 et 3.2, où l'on cherche à comprendre l'impact de différents facteurs abiotiques et plante-spécifiques sur le microbiote endosphérique racinaire de la vigne ainsi que la dynamique temporelle des communautés microbiennes, reposent sur un plan d'expérience mis en place avec Château Palmer au sein du domaine viticole (Margaux, France). Au sein de ce domaine, 37 parcelles ont été sélectionnées sur différents critères (cépages, âge, localisation) afin de couvrir un large éventail de caractéristiques représentatives du domaine Palmer (66 ha de vignes). Au sein de chaque parcelle, 8 pieds de vigne équidistants ont été sélectionnés (et marqués) avec l'aide du personnel de Palmer afin de s'affranchir des complants et de s'assurer de l'intégrité des pieds de vigne échantillonnés. Les racines de ces pieds ont été échantillonnées à deux dates par année, et ce, pendant 2 ans pour un total de 1184 échantillons (Juin 2018, Septembre 2018, Juin 2019 et Septembre 2019) (Figure 3). La gamme des âges des plants de vigne est comprise entre 3 et 80 ans. Les deux cépages étudiés (le Cabernet-Sauvignon et le Merlot, principaux cépages du Médoc) sont chacun représentés par un nombre équivalent de parcelles. La taille moyenne des parcelles sélectionnées est de 0,79 ha (+/- 0,36 ha). Le type de sol dominant du domaine et qui impacte majoritairement le style des vins est le brunisols gravelo-sableux sur graves sablo-argileuses bariolées en sous-sol (dépôts alluviaux de l'ère quaternaire). Les principales variantes intègrent soit du lessivage (migration des argiles et du fer vers le sous-sol), soit un caractère rédoxique (stagnation d'eau libre pendant l'hiver et le printemps), soit un approfondissement de la couverture sableuses (le plus souvent du fait de phénomènes de colluvionnement liés à l'érosion).

La campagne d'échantillonnage de Juin 2018 (Chapitre 3.1), du fait de sa différence de profondeur de séquençage avec les autres campagnes (voir le paragraphe E-Bioinformatique), a servi à tester l'effet des caractéristiques du sol (ratio C/N, contenu en matière organique (MO), pH et P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (g/kg)) et des facteurs spécifiques de la vigne (âge et cépage) (les caractéristiques des parcelles sont détaillées dans le Tableau 1 en annexe). Par ailleurs, du fait du manque de profondeur de séquençage, seules 34 et 36 parcelles sur les 37 parcelles échantillonnées constituent respectivement le jeu de données des bactéries et des champignons (voir le paragraphe E-Bioinformatique). Les paramètres physico-chimiques de sol ont été caractérisés sur des échantillons de sol collectés à une profondeur de 25 cm. Ces échantillons de sol sont composés d'un mélange de cinq sous-échantillons de sol par parcelle représentant différentes zones d'une parcelle. Toutes les mesures ont été effectuées par Auréa AgroSciences (Ardon, France) à la demande des vignerons pour d'autres objectifs de gestion du vignoble.

Les trois campagnes d'échantillonnage de Septembre 2018, Juin 2019 et Septembre 2019 (Chapitre 3.2) ont, quant à elles, permis d'analyser la dynamique temporelle intra- et inter-annuelle du microbiote endosphérique racinaire. Pour cette analyse, seules 25 des 37 parcelles échantillonnées et séquencées constituent le jeu de données utilisé pour l'article du chapitre 3.2. En effet, après



vérification et analyses préliminaires, 12 parcelles (6 Cabernet-Sauvignon et 6 Merlot) présentaient un profil microbien très atypique à une seule date d'échantillonnage. Ne pouvant exclure l'hypothèse d'un problème méthodologique, nous avons donc fait le choix de ne pas prendre en compte ces parcelles dans l'analyse de la dynamique temporelle (voir le paragraphe E-Bioinformatique pour plus de détails).



## D. Conditionnement des racines et biologie moléculaire

L'ensemble des prélèvements racinaires a été effectué avec des gants de laboratoire et chaque appareil racinaire a été individuellement conditionné dans des sacs hermétiques placés dans des boîtes réfrigérées pour le transport. Immédiatement, les racines ont été entièrement nettoyées à l'eau du robinet (élimination des débris et du sol rhizosphérique), puis lavées avec une solution de Triton X100 (5‰) (détergent, élimination des contaminants et microorganismes de surface) et enfin, abondamment

## Chapitre 1 - Éléments de méthodologie

rincées plusieurs fois à l'eau ultra pure. Après cette étape de nettoyage, les racines ont été placées dans des microtubes de façon stérile (lavage des outils à l'éthanol 70% entre chaque racine) et stockées à -80°C jusqu'à l'étape d'extraction d'ADN.

L'ADN total des racines a été extrait par la plateforme GENTYANE (Clermont-Ferrand, France) grâce à la technologie des billes magnétiques (Sbeadex) sur un automate Oktopure LGC Genomics. Après le broyage mécanique de l'échantillon, les acides nucléiques ont été capturés avec les particules magnétiques sbeadex™. Après des étapes de lavage pour éliminer les impuretés, l'acide nucléique a été élué dans le tampon d'élution Beadex. La concentration en ADN a été mesurée à l'aide du réactif Hoechst 33258 et d'un instrument TECAN Infinite 1000. Les extraits d'ADN ont ensuite été stockés à -20 °C jusqu'aux prochaines étapes de production des amplicons et de séquençage.

La communauté fongique de l'endosphère racinaire a été analysée par amplification par PCR d'un fragment du gène de l'ARNr 18S (régions V4 partielle et V5) avec les amorces fongiques spécifiques: NS22b (5'-AATTAAGCAGACAAATCACT-3') et SSU817 (5'-TTAGCATGGAATAATRRRAATAGGA-3'). La communauté bactérienne a, quant à elle, été analysée à partir de l'amplification d'un fragment du gène de l'ARNr 16S (régions V5-V7) en utilisant les amorces bactériennes 799F (5'-AACMGGATTAGATACCKG-3') et 1223R (5'-CCATTGTAGTACGTGTGTA-3'). Ces amorces ont été choisies parce qu'elles n'amplifient pas l'ADN végétal et permettent *in silico* la meilleure amplification de séquences bactériennes à partir des bases de données Sylva et GreenGenes par rapport aux autres jeux d'amorces couramment utilisés (analyse comparative *in silico* non publiée). Les deux jeux d'amorces ont été personnalisés pour inclure un identifiant unique par échantillon et les adaptateurs Illumina®. Pour assurer une amplification homogène par PCR (mix standardisé) et éviter toute contamination, des billes Illustra™PuReTaq Ready-to-go (GE Healthcare®) ont été utilisées pour toutes les amplifications de cette thèse. Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes : dénaturation initiale (95 °C, 4 min) puis 35 cycles d'amplification (95 °C, 30 sec - 54 °C, 30 sec - 72°C, 1min) suivis de l'étape d'extension finale (72°C, 10min) pour l'amplification fongique et dénaturation initiale (95 °C, 4 min) puis 35 cycles (95 °C, 30 sec - 53.5 °C, 30 sec - 72°C, 1min) suivis de l'étape d'extension finale (72°C, 10min) pour l'amplification bactérienne. Les produits PCR ont été purifiés avec des billes magnétiques AMPureXP (Agencourt®) à l'aide d'une plateforme automatisée de manipulation de liquides Agilent Bravo (Agilent®) et quantifiés avec un kit de dosage Quant-iT PicoGreen™ dsDNA pour permettre une normalisation à la même concentration. La préparation des librairies et les séquençages Illumina ont été réalisés à la plateforme EcogenO (Rennes, France). Les étapes de préparation des librairies comprennent une deuxième PCR utilisant la machine Smartchip-Real Time PCR (Takara) afin d'effectuer un marquage multiplex P5-P7 d'Illumina (jusqu'à 384 amplicons en une seule étape de PCR), la purification du pool d'amplicons marqués obtenus après la seconde PCR (AMPureXP,

Agencourt®) et la quantification de ce pool à l'aide du kit Kapa-Illumina® (qPCR sur le LC480 LightCycler de Roche®).

Pour l'article du chapitre 2 (plantes chimériques et holobionte), les amplicons bactériens des deux dates de prélèvements ont été poolés en deux librairies individuelles et séquencés sur une plateforme Illumina MiSeq avec un kit de séquençage Paired-End 2x250 cycles (2 runs de séquençages). Pour l'article de chapitre 3.1 (campagne d'échantillonnage de Juin 2018), les amplicons bactériens et fongiques ont été mélangés en un seul pool et séquencés sur une plateforme Illumina MiSeq avec un kit de séquençage Paired-End 2x250 cycles (1 run de séquençage). Pour l'article de chapitre 3.2 (campagnes d'échantillonnage de Septembre 2018, Juin 2019 et Septembre 2019), les amplicons bactériens et fongiques de chacune des dates ont été poolés en librairies individuelles et séquencés sur une plateforme Illumina MiSeq avec un kit de séquençage Paired-End 2x250 cycles (bactéries - amplicon d'environ 420 pb) et Paired-End 2x300 cycles (champignons - amplicon d'environ 540 pb) (6 runs de séquençage).

### E. Analyses bioinformatiques

L'étape de base calling a été réalisée sur l'instrument MiSeq avec le logiciel CASAVA v1.8 (Illumina). Le trimming des données de séquençage a consisté à retirer les amorces et à supprimer les lectures contenant des bases non identifiées à l'aide du logiciel Cutadapt.

Pour l'article du chapitre 2 (plantes chimériques et holobionte), les lectures brutes ont été traitées à l'aide de USEARCH (Edgar, 2010). Dans un premier temps, les extrémités appariées ont été fusionnées à l'aide de la commande USEARCH fastq\_mergepairs (fastq\_maxdiffs = 2, fixant le nombre maximal de mésappariements dans l'alignement à 2 pb), puis elles ont été tronquées à 410 pb (USEARCH fastq\_filter : fastq\_trunclen = 410, fastq\_maxee = 0,01). Seules les séquences restantes ont été utilisées pour trouver l'ensemble des séquences uniques (USEARCH fastx\_uniques). Les séquences uniques ont ensuite été nettoyées (*denoising*) à l'aide de l'algorithme UNOISE (Edgar, 2016), qui effectue la correction des erreurs et la suppression des chimères (USEARCH unoise3 : unoise\_alpha = 2 et minsize = 200), afin d'obtenir une liste plus restreinte d'unités taxonomiques opérationnelles à rayon zéro (ZOTU) (100% d'identité ; Edgar, 2016), une des procédures générant des ASVs.

Pour l'article de chapitre 3.1 (campagne d'échantillonnage de Juin 2018), comme nous avons mélangé des amplicons bactériens et fongiques dans un seul run de séquençage, nous avons, dans un premier temps, traité les fichiers fastq pour séparer les deux types de séquences (bactéries et champignons) sur la base de leur séquence d'ADN spécifique (script développé par Marc Aubry - plateforme EcogenO), puis nous avons analysé séparément les deux jeux de données. Par ailleurs, comme nous avons séquencé les amplicons fongiques (~540 pb) avec un kit 2x250 cycles (fragments de séquençage de 500 pb maximum), car la chimie des kits 2x300 cycles (600 pb) n'était alors pas de

bonne qualité (diminution de la qualité de séquençage dès 220/250 pb), il ne nous était pas possible de fusionner les séquences R1 et R2 (forward et reverse) de séquençage (partie chevauchante manquante). Avant d'entrer ce jeu de données dans le pipeline d'analyse bioinformatique FROGS (FROGS : voir ci-dessous), nous avons supprimé les séquences spécifiques des amorces fongiques des séquences R1 et R2 à l'aide du logiciel Cutadapt. Nous avons ensuite analysé les séquences R1 (R1) et R2 (R2) séparément dans le pipeline de bioinformatique FROGS et n'avons gardé que la matrice de contingence finale du R1 pour les analyses statistiques (meilleure qualité de séquençage et d'affiliation aux bases de données).

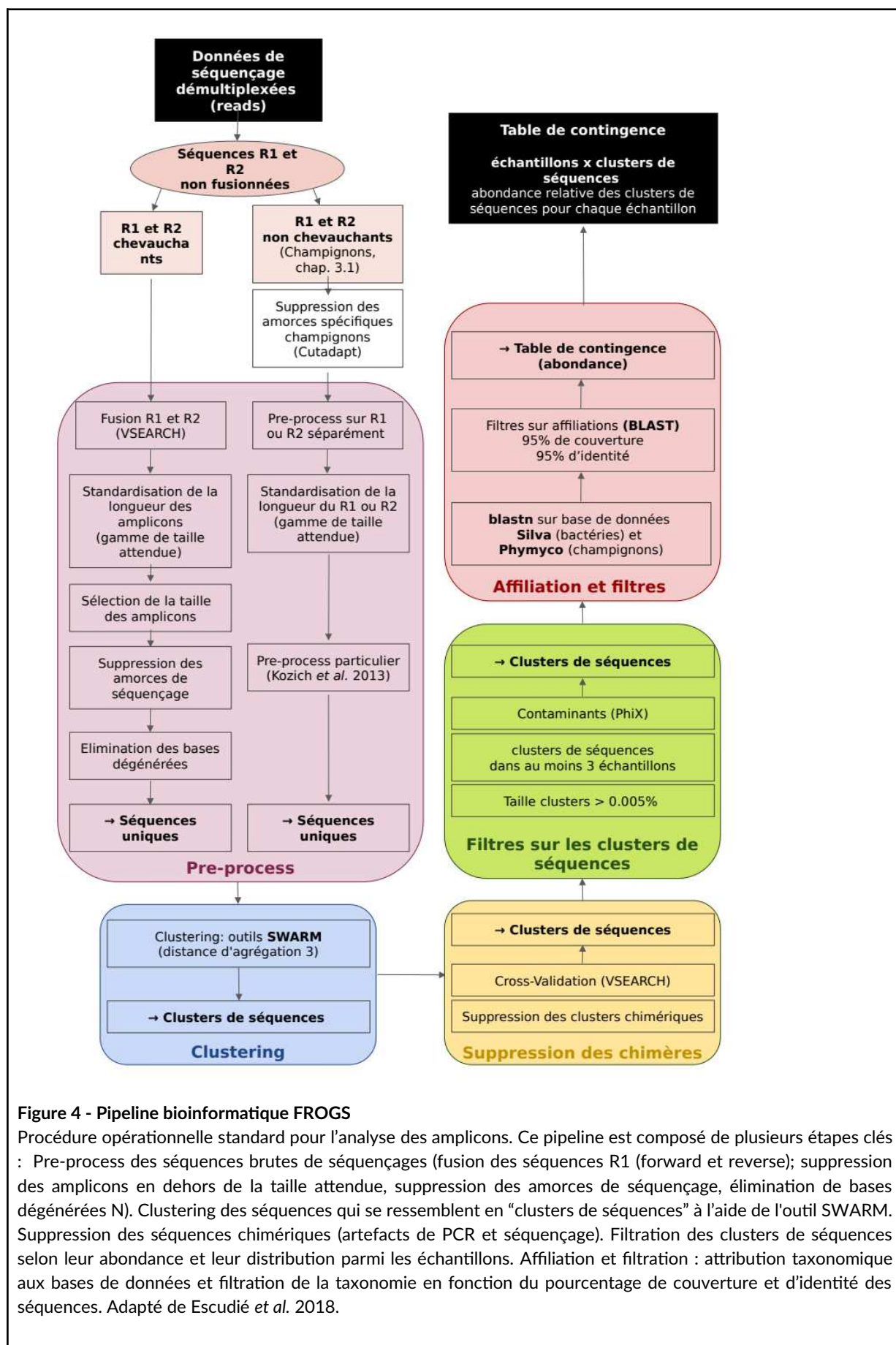
Pour l'article de chapitre 3.2 (3 campagnes d'échantillonnage), l'ensemble des séquences R1 et R2 bactériennes et fongiques a pu être fusionné (kits Illumina 500 pb et 600 pb utilisés respectivement pour les bactéries et les champignons). Pour chaque type microbien, les séquences des 3 dates d'échantillonnage ont été regroupées en un seul fichier afin d'être traitées uniformément dans le pipeline d'analyse FROGS (FROGS : voir ci-dessous).

Le pipeline d'analyse FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) a été développé par la plateforme GenoToul de Toulouse (Escudié *et al.* 2018) (Figure 4). Le pipeline FROGS inclut notamment la stratégie de clustering SWARM qui permet d'analyser les séquences sans utiliser le seuil d'identité standard des OTUs classiques (97%) (Unité Taxonomique Opérationnelle, Operational Taxonomic Unit). SWARM permet alors de produire ce que nous appelons ici des "clusters de séquences". L'ensemble des étapes a été réalisé selon les recommandations des auteurs, à l'exception des données fongiques de l'article du chapitre 3.1 (séquences R1). Pour ce jeu de données, et en collaboration avec les auteurs de l'article, nous avons réalisé une étape de pré-processing particulière permettant de supprimer les adaptateurs Illumina à chaque extrémité et de suivre par la suite la procédure standard. Les étapes principales de ce pipeline sont les suivantes : utilisation d'un algorithme spécifique pour le débruitage (*denoising*); production de clusters (SWARM Mahé *et al.* 2014), distance d'agrégation  $d=3$ ); suppression des chimères, application de filtres rigoureux pour éviter les clusters artificiels de séquences et pour assurer une analyse de haute qualité (*proportion minimum de séquences = 0,00005, ie; conserver les clusters de séquences qui possèdent au moins 0.05% de l'ensemble des séquences - Garder les clusters de séquences présents dans au moins 3 échantillons*). Les clusters de séquences sont ensuite filtrés en utilisant la qualité des affiliations avec un seuil d'au moins 95% de couverture et 95% d'identité BLAST. Enfin, les affiliations taxonomiques sont déterminées en utilisant les bases de données Silva132 ou 138 16S rRNA pour les bactéries (Quast *et al.* 2012) et Phymyco-DB pour les champignons (Mahé *et al.* 2012). Les données de sortie du pipeline FROGS sont des matrices de contingences (échantillons x clusters de séquences et leur abondance relative pour chaque échantillon).

Pour effectuer les analyses statistiques ultérieures, le nombre de séquences pour chaque ensemble de données bactériennes et fongiques a été par la suite normalisé (fonction "rarrefy" du

## *Chapitre 1 - Éléments de méthodologie*

package Vegan, Logiciel R). Sur la base d'observations graphiques (courbes de raréfaction), nous avons normalisé au même nombre de séquences les jeux de données bactériens et fongiques. De ce fait, pour l'article du chapitre 3.1 (campagne d'échantillonnage de Juin 2018), les échantillons avec moins de séquences que le seuil de raréfaction fixé ont été retirés de l'ensemble du jeu de données, diminuant alors le nombre de parcelles à 34 et 36 parcelles respectivement pour les données bactériennes et fongiques. Pour l'article de chapitre 3.2 (3 campagnes d'échantillonnage), aucune des 37 parcelles n'a été éliminée après raréfaction. Cependant, seules 25 parcelles ont été retenues pour cette analyse. En effet, après analyses préliminaires sur le jeu de données total (alpha-diversité et beta-diversité), 12 parcelles présentaient un profil très atypique à la date de Septembre 2018 (alpha-diversité très faible et regroupement très fort en beta-diversité). Après vérification de la partie biologie moléculaire (PCR et séquençage) et bioinformatique, aucune particularité et aucun problème n'a pu être relevé. Cependant, comme nous ne maîtrisons pas la partie extraction, il est possible que cette étape soit la cause de ce profil atypique. Par ailleurs, après vérification auprès des viticulteurs, aucun traitement particulier ou travail du sol ne peuvent expliquer cette typicité à cette seule date. Comme un problème méthodologique ne peut être exclu, nous avons donc pris la décision de ne pas inclure ces 12 parcelles dans cette analyse pour ne pas fausser, ou du moins cacher, les signaux généraux de la dynamique temporelle.



**Figure 4 - Pipeline bioinformatique FROGS**

Procédure opérationnelle standard pour l'analyse des amplicons. Ce pipeline est composé de plusieurs étapes clés : Pre-process des séquences brutes de séquençages (fusion des séquences R1 (forward et reverse)); suppression des amplicons en dehors de la taille attendue, suppression des amorces de séquençage, élimination de bases dégénérées N). Clustering des séquences qui se ressemblent en "clusters de séquences" à l'aide de l'outil SWARM. Suppression des séquences chimériques (artefacts de PCR et séquençage). Filtration des clusters de séquences selon leur abondance et leur distribution parmi les échantillons. Affiliation et filtration : attribution taxonomique aux bases de données et filtration de la taxonomie en fonction du pourcentage de couverture et d'identité des séquences. Adapté de Escudié *et al.* 2018.





## **CHAPITRE 2 - LA VIGNE COMME HOLOBIONTE**

**Évaluation du concept d'holobionte par l'analyse du microbiote endosphérique de plantes chimériques**





## **Résumé du Chapitre 2 -Concept d'holobionte et microbiote de plantes chimériques**

Les plantes s'associent aux micro-organismes à différents degrés d'interaction et aucune exception n'est connue à ce jour dans la nature. Ces associations couvrent un large éventail de types d'interactions symbiotiques (bénéfiques, neutres ou désavantageuses) et le concept d'holobionte, qui a émergé dans les années 90, rend compte de ces partenariats. L'holobionte est défini comme l'entité émergente résultant de multiples interactions entre un hôte et ses microorganismes symbiotiques. De nombreuses études ont démontré que les symbiotes d'un hôte donné peuvent avoir un impact profond sur le phénotype réalisé de cet hôte. Comme le phénotype est le résultat observable de l'hôte, des microorganismes et de l'interaction des deux, l'évolution du phénotype ne peut se faire sans tenir compte des multiples façons dont l'holobionte et le contenu génomique de l'holobionte (c'est-à-dire l'hologénome) ont un impact sur ce phénotype. Ce dernier point est l'idée maîtresse de la théorie de l'hologénome.

Malgré le développement raisonnable de ces concepts dans le monde scientifique, leur légitimité et leur valeur ont été et sont encore débattues, du moins en partie, en raison de malentendus ou de l'utilisation de définitions erronées, mais également du fait de la nouveauté de ce cadre conceptuel et du manque de preuves expérimentales.

Il est bien établi que le microbiote des plantes contribue largement à la *fitness* et la survie de leur hôte via la nutrition, la résistance et la résilience à des conditions de stress et qu'une plante hôte peut recruter activement des micro-organismes spécifiques à partir de réservoirs locaux. Les plantes sont donc très dépendantes de leur microbiote et constituent de bons modèles pour aborder les hypothèses liées au concept d'holobionte.

Chez les plantes et une grande partie des animaux, une majorité des microorganismes constitutifs du microbiote sont acquis horizontalement et la question de savoir si ce recrutement est en majorité actif ou passif est donc centrale pour évaluer le concept d'holobionte. L'existence d'une grande hétérogénéité entre les communautés de microorganismes colonisant les racines de plantes voisines peut, dans un premier temps, être en faveur de l'hypothèse selon laquelle le microbiote des plantes est sous influence de processus stochastiques. Cependant, il est également raisonnable de penser que cette hétérogénéité observée peut être le fruit d'une filtration préférentielle forte entre les différents hôtes. Ainsi, une meilleure compréhension de l'hétérogénéité du microbiote est essentielle pour accepter ou rejeter l'holobionte comme unité de sélection plausible.

Pour évaluer l'importance de la sélection dans la formation de l'holobionte/hologénome et tester la légitimité de ces concepts, nous avons manipulé expérimentalement une plante hôte en créant des hôtes chimériques (c'est-à-dire des plantes greffées). Plus précisément, nous avons cultivé une plante A, une plante B, une plante A/B (scion greffé sur un porte-greffe), et une plante B/A (greffe réciproque), et ce, sur deux modèles biologiques distincts.

Nous avons émis l'hypothèse que (i) le modèle de recrutement est passif (hypothèse nulle, l'holobionte est une construction intellectuelle et théorique) et, par conséquent, des différences stochastiques plus importantes dans le microbiote entre les plantes sont attendues. (ii) le modèle de recrutement est façonné par la plante hôte et, par conséquent, le microbiote de A diffère de celui de B, mais les greffes A/B et B/A devraient être similaires et proches de A et B. (iii) la greffe perturbe les molécules de signalisation impliquées dans le recrutement des micro-organismes, et de ce fait, le microbiote de A/B et B/A diffère de celui des témoins. Si cela est vrai, les plantes chimériques fourniraient un proxy du recrutement passif vs actif, et donc une estimation de la proportion de la communauté qui est activement recrutée.

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons analysé les bactéries endosphériques des racines des différentes conditions de greffage de plants de vignes (plante pérenne et ligneuse) et de plants de pastèque greffés avec la courge (plantes annuelles) (15 réplicats par condition, 2 dates d'échantillonnage pour la vigne, une seule date pour le système courge/pastèque). Nous avons ensuite analysé la richesse, la composition des communautés bactériennes des différentes conditions de greffage (analyse en coordonnées principales - PCoA) ainsi que la part des processus déterministes dans l'assemblage de ces communautés du microbiote de l'endosphère des racines.

Dans cette étude, les analyses indépendantes du microbiote endosphérique racinaire ont démontré une différenciation entre les communautés microbiennes qui colonisent les racines dans les deux modèles biologiques démontrant que le recrutement est façonné par la plante hôte.

De plus, nous avons démontré une forte similarité des communautés bactériennes entre les conditions possédant le même porte-greffe pour une richesse et une diversité bactérienne en grande partie comparable entre les modalités. Nous avons mis en avant les rôles significatifs du porte-greffe, du greffon et l'interaction des deux dans la structuration des communautés, quels que soient le modèle biologique et la date de prélèvement bien que le porte-greffe ait un effet dominant dans la plupart des combinaisons testées. Par ailleurs, nos résultats confirment l'existence d'un recrutement actif de différents taxa au sein de l'endosphère racinaire de plantes greffées (chimériques) et démontrent que la provenance de ces taxa activement sélectionnés par l'hôte proviennent majoritairement du porte-greffe.

Notre plan d'expérience confirme invariablement que le microbiote de ces chimères est bien soumis à des processus déterministes. L'hypothèse nulle selon laquelle l'holobionte est une construction purement intellectuelle est donc rejetée. Ce travail pionnier renforce donc l'idée que les plantes doivent être considérées comme des holobiontes dans une perspective évolutive.

**Evaluating the holobiont concept by the analysis of the root-endosphere  
microbiota of chimeric plants**

Biget M<sup>1+</sup>, Wang T<sup>2+</sup>, Mony C<sup>1</sup>, Xu Q<sup>2</sup>, Lecoq L<sup>1</sup>, Chable V<sup>3</sup>, Theis K<sup>4,5</sup>, Bordenstein S<sup>6,7,8,9</sup>, Ling N<sup>2</sup>,  
Vandenkoornhuyse P<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Rennes 1, CNRS, UMR 6553 ECOBIO (écosystèmes, biodiversité, évolution), F-35000 Rennes, France

<sup>2</sup> Jiangsu Provincial Key Lab for Organic Solid Waste Utilization, National Engineering Research Center for Organic-based Fertilizers, Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

<sup>3</sup> UMR BAGAP INRAE, Centre Bretagne-Normandie, France

<sup>4</sup> Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA

<sup>5</sup> Perinatal Research Initiative in Maternal, Perinatal and Child Health, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA

<sup>6</sup> Department of Biological Sciences, Vanderbilt University, Nashville, TN 37235, USA

<sup>7</sup> Vanderbilt Microbiome Initiative, Vanderbilt University, Nashville, TN 37235, USA

<sup>8</sup> Department of Pathology, Microbiology, and Immunology, Vanderbilt University, Nashville, TN 37235, USA

<sup>9</sup> Vanderbilt Institute for Infection, Immunology and Inflammation, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37235, USA

<sup>+</sup>the 2 authors have contributed equally

\*corresponding author: UMR 6553 Ecobio, CNRS - University of Rennes 1, Avenue du General Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France – Phone : +33 (0)2.23.23.50.07 - E-mail: [philippe.vandenkoornhuyse@univ-rennes1.fr](mailto:philippe.vandenkoornhuyse@univ-rennes1.fr)

*~ In prep. (draft)~*

**~ targeted journal : PNAS~**

## **Abstract**

The holobiont and hologenome concepts consider the entity formed by a host and its microbiota as a new level of hierarchical organization. These concepts, which reboot our perception of an individual, require experiments to determine whether or not they are only a theoretical construction. We thus designed an experiment to evaluate the validity of the holobiont concept using grafted plants with the idea that if the microbiota of these chimeric plants is randomly assembled, the holobiont concept would be of limited importance for plants. We analyzed the root-endosphere microbiota of two independent model plant systems in four experimental treatments: with ungrafted plants and two reciprocal grafting possibilities. We used advanced statistical analyses to explore the patterns displayed by the root-endosphere microbiota. As expected, we found very different microbiota compositions in grafted and ungrafted conditions in two independent experiments. The results indicate a non-random assembly of bacterial communities inhabiting the root endosphere of chimeric plants with a stronger effect of the rootstock on the recruitment of microorganisms. Because chimeric plants did not have a completely random microbiota, the null hypothesis “holobionts do not exist and are rather an intellectual construction only” could not be validated. Rather our results indicated that existing forces control holobiont composition. Understanding how this functional entity (holobiont) is built and how, together, the plant and the microbiota, are capable of buffering variations in the environment, is one of the main challenges facing plant management in the context of sustainable agriculture.

## **Significance statement**

The holobiont and hologenome concepts posit that a host and its associated microorganisms form an individual and hence invite us to reconsider what an individual is. We used chimeric plants, i.e. grafted plants, to challenge the concepts. Recruitment of the root endosphere microbiota was dominated by a determinist process of endosphere assembly mainly controlled by the rootstock. The independent experiments performed led to the same conclusion: forces likely resulting from a long lasting coevolutionary processes drive microbiota assemblages in roots. Thus, the holobiont concept and tenets of the hologenome theory and are not violated in our grafted plants. Beyond the experimental demonstration that the holobiont concept cannot be rejected, the study opens new avenues for a better understanding of plants and more broadly of macroorganisms such as holobionts.

**Keywords** Holobiont, chimeric plant, root endosphere bacteria, determinism

## **Introduction**

Multicellular organisms, both plants and animals, associate with different types of microorganisms and no exception has yet been encountered in nature (1). These associations vary along the spectrum of symbiotic interactions (beneficial, neutral, or detrimental relationships) (2). The holobiont concept captures these inevitable partnerships by defining the holobiont as the emerging entity resulting from multivarious associations between a host macrobe and its microbial symbionts (3). It has repeatedly been shown that the symbionts of a given host can deeply impact the realized phenotype of animals (e.g. 3, 4) and plants (e.g. 5, 6). According to neo-Darwinian theory, natural selection acts on the organism's traits (e.g. 7) and its realized phenotypes (8–10). The evolution of phenotypes can thus not be understood without considering the many different ways in which the holobiont and the genomic content of the holobiont (i.e. the hologenome) impact phenotypes (8, 9, 11). This is the cornerstone of the hologenome theory (12), but this concept has yet to be conclusively demonstrated.

The hologenome concept encompasses the potential for both selective forces and genetic drift to shape population-level changes in holobiont phenotypes over time. These variations create a base of holobiont diversity upon which natural selection can then act. Despite the reasonable development of the holobiont and hologenome concepts, their legitimacy and value have been the subject of debate, at least partially due to misunderstandings or the use of wrong definitions (13), but also because the conceptual framework is new and the theory has yet to be challenged experimentally (13).

In this framework, it is acknowledged that the plant microbiota that form complex co-associations with plants, largely contribute to plant fitness and productivity by influencing host nutrition and by enhancing plant resistance and resilience during stressful conditions (14, 15). Plants adjust their phenotype to adapt to environmental oscillations using epigenetic mechanisms and by recruiting microorganisms (6). Plants are thus strongly dependent on their microbiota (5, 6), and are good models to address hypotheses related to the holobiont concept.

It is well established that a host-plant can actively recruit particular microorganisms from local reservoirs, for example, legumes recruit Rhizobia, or more widely, plants recruit arbuscular mycorrhiza (5). More generally, plants are colonized by a wide range of bacteria, fungi and archaea (e.g. 16–19) recruited from the environment (5). Are all these microorganisms coevolved with their host? Put in another way, do these horizontally transmitted microorganisms colonize their host simply by chance or in response to deterministic forces shaped by the genetic background of the host? This question is important because in plants and in a large proportion of animals, the majority of microorganisms that form the microbiota are acquired horizontally (e.g. 5, 20, 21). The question of the active or passive recruitment of these horizontally acquired microbial components within the microbiota is thus a key to evaluating the holobiont concept of individuals. Passive acquisition is assumed to be central if coevolution processes are not at play. Thus, “stochastic recruitment”, the possibility for any

microorganisms living close to the roots to be part of the root microbiota endosphere by chance, but obeying the rules of microbial community assembly (i.e., synergies, antagonisms, competition), is assumed to control horizontal recruitment. Thus, the null hypothesis to be tested is that the holobiont is only an intellectual construction and that neutrality shapes the microbiota assembly in the host plant. Under this assumption, the root microbiota can also be considered as an independent ecosystem that ultimately renders services to its host.

Marked heterogeneity among microorganism communities has been observed in the roots of co-occurring individual plants (e.g. 18). At first sight, this heterogeneity suggests that neutrality shapes the plant microbiota. However, the heterogeneity could also be the consequence of a locally heterogeneous soil microbial reservoir. Observed heterogeneity is thus not necessarily paired with stochastic recruitment (see definition above). Furthermore, under the assumption of stochastic recruitment, there is no reason for such high filtration between the soil microbial rhizosphere (i.e. the community of microorganisms living close to the roots) and the root endosphere (e.g. 5). A better understanding of microbiota heterogeneity is the key to accepting or rejecting the holobiont as a plausible unit of selection. To evaluate the significance of neutrality and selection in shaping the holobiont, the extent to which the plant-associated microbiota has coevolved with its host has to be tested experimentally. To this end, we experimentally manipulated the host-plant by creating chimeric hosts (i.e. grafted plants) to test the holobiont concept; specifically, we grew plant A, plant B, plant A/B (grafted scion from A on a rootstock from B), and plant B/A (reciprocal grafting).

We hypothesized that (i) the pattern of recruitment is only passive (null hypothesis, plant holobionts cannot be consistent units of selection) and, as a consequence, higher stochastic differences in the microbiota community among plants are expected. (ii) Alternatively, the pattern of recruitment is shaped by the host plant and, as a consequence, the microbiota of A differs from that of B but grafting A/B and B/A would be expected to produce similar microbiota that are close to A and B. (iii) Grafting (creating a chimeric plant) is known to modify the recruitment of microorganisms (e.g. 22), and microbiota in A/B and B/A that differ from those of the controls are therefore expected. If this is true, the chimeric plants would be a proxy of passive vs active recruitment, and hence enable estimation of the proportion of the community that is actively recruited. To test these hypotheses, we analyzed the root-endospheric bacteria in two experiments involving two different plant systems. The results of the experiments will enable us to determine if the artificially created evolutionary selection obtained using plant grafting systems intentionally disrupted the recruitment of plant root endophytes, with potential significance for holobiont manipulation.

## **Results**

The root-endosphere microbiota was analyzed using the same experimental design but with two levels of biological integration: grafted species (in the Chinese experiment with watermelon/bottle-gourd),

grafted cultivars/genotypes (in the French experiment with grapevine), meaning we tested the holobiont concept at both the species and genotype/ “cultivar” levels (Figure 1). In the two grapevine sub-experiments (named 101/C and F/C experiments), we tested four combinations per sub-experiments at two times points (T1 and T2) : (1) ungrafted Chenin grape vine (C); (2) ungrafted American “wild” hybrid grapevine (101); (3) Chenin grapevine grafted on American “wild” hybrid grapevine (C101) - (4) American “wild” hybrid grapevine grafted on Chenin grapevine (101C) & (1’) ungrafted Chenin grape vine (C); (2’) ungrafted Fercal grapevine (F); (3’) Chenin grapevine grafted on Fercal grapevine (CF); (4’) Fercal grapevine grafted on Chenin grapevine (FC). (Figure 1) For the watermelon/bottle-gourd experiment, four different conditions have been tested at one time point : (1) ungrafted watermelon (W); (2) ungrafted bottle gourd (B); (3) watermelon grafted on bottle gourd (WB); (4) bottle gourd grafted on watermelon (BW) (Figure 1).

### **The bacterial communities, and the richness and diversity of the chimeric plants were similar to those of ungrafted plants**

The composition of the root-endosphere bacterial communities in the two grapevine experimental genotype combinations were found to be similar and were dominated by Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria the first and second times they were sampled, respectively, (hereafter T1 and T2) (Figure S1A, B and S1D, E) but differed from the bacterial composition in the root-endosphere in the watermelon/bottle-gourd (W/B) experiments (Figure S1C). We analyzed root endospheric bacterial richness and diversity (Chao1 index) between the ungrafted and grafted combinations (Figure S2). In the W/B experiment, no significant differences in richness and diversity were found between treatments (Figure S2C, H). In the grapevine experiments, only roots of the grafted vines Chenin/Fercal (i.e., CF and FC) harbored significantly higher richness and diversity than ungrafted plants in bacterial zOTUs at T1 only (Figure S2B, G; no significant differences were found at T2 Figure S2D, E, I, J).

### **The rootstocks impacted the composition of root microbiota of chimeric plants**

We used principal coordinate analysis (PCoA) and two-way PERMANOVA to test for potential shifts in bacterial community composition depending on grafting conditions (Figure 2, Figure S3). Overall, we demonstrated differences among treatments with distinct groups between conditions with the same rootstocks (Figure 2, Figure S3). We also found that the rootstocks had more influence on bacterial community composition than the scions in all the grapevine experiments (C/101 grapevine experiment, Figure 2A; F/C grapevine experiment, Figure 2B; W/B experiment, Figure 2C). This effect was confirmed on the two root-sampling dates (T1 and T2) (Figure 2, Figure S3).

### **Deterministic assemblages of the root-endosphere microbiota of the chimeric plants**

We conducted Sloan neutral model community analyses (NMC) to identify the stochastic and deterministic drivers of the bacterial communities on the roots of the grafted chimeric plants (Figure 3,



Figure S4). For this purpose, we used ungrafted metacommunities (B and W; 101 and C; F and C) as source communities for each experiment. Overall, the occurrence frequency of bacterial taxa fitted the neutral models in each experiment well (T1: 101C:  $R^2=0.44$ ; C101:  $R^2=0.42$  - T2: 101C:  $R^2=0.67$ ; C101:  $R^2=0.60$  - T1: FC:  $R^2=0.39$ ; CF:  $R^2=0.50$  - T2: FC:  $R^2=0.61$ ; CF:  $R^2=0.55$  - WB:  $R^2=0.12$ ; BW:  $R^2=0.09$  - Figure 3, Figure S4; graphs on the left). In all the experiments, some taxa occurred more or less frequently than predicted by the neutral models, the neutrality envelope being the vectorial space between the two dashed lines (Figure 3, Figure S4). Above the neutrality interval, the yellow bacterial taxa (Figure 3, Figure S4) overlapped more consistently in grafted plants than expected, i.e. were more abundant than expected, and were interpreted as being actively maintained and selected by the host plant, whereas the green taxa below the neutrality interval, (Figure 3, Figure S4) overlapped less than expected in grafted plants, i.e. were less abundant than expected, implying active counter-selection by the host (Figure 3, Figure S4).

Across the two biological experiments, from a minimum of ~20% (T1 - 101/C, Figure 3A) to more than 80% (T1-F/C, Figure 3C) of the bacterial taxa detected in the grafted plants were outside the neutrality interval. Thus, the more- and less-abundant taxa than expected from neutral distribution represent a proportion that is far from neglectable. Among the root endosphere taxa that were more abundant, Alphaproteobacteria were consistently overrepresented in the two independent biological independent experiments (Figure S5). The taxa that comprised the more abundant fraction than expected were consistently largely shared between ungrafted and grafted plants (Figure S5), whereas a very limited number of taxa were specific to a grafting mode. However, differences in the composition of taxa that were more abundant than expected were observed within and between the experiments (Figure S5), for instance see *Bacillus* in the watermelon/bottle-gourd experiment Figure S5E, F).

A Bayesian approach was used to estimate the proportion of taxa originating from each source (i.e., ungrafted related). The results of source tracking invariably indicated that both the rootstock and scion explained a fraction of the root endosphere taxa that were over-represented, hence a detectable specific effect of both parts of the plants on the recruited microbiota (bar charts in Figure 3, Figure S4). Source tracking analysis also shows that the largest proportion of over-represented taxa could not be explained (unknown in the bar charts, Figure 3, Figure S4) because both sources contained the taxa considered and the higher frequency of the taxa could be the consequence of the scion or the rootstock or of both parts of the chimeric plant.

Taken altogether, these results indicated a non-random assembly of bacterial communities inhabiting the root endosphere of the chimeric plants with a greater effect of the rootstock on actively recruited taxa.

## Discussion

In the holobiont framework, if selective pressures shape the composition of the holobiont, it can be predicted that a large proportion of the host associated microorganisms will be specific to the genetic background of the hosts and that the heterogeneity observed among host microbiota of similar genetic background is related to differences in the reservoir of recruitable microorganisms. Alternatively, if holobionts are only intellectual constructions, i.e. objects that do not actually exist, their microbiota would be assumed to result primarily from neutral forces of change and heterogeneous and stochastic microbiota compositions would be expected across different individual hosts. For a broad scientific impact, two plant types (perennial and annual plants) and two levels of analyses, the genotype level (with the grapevine manipulation) and the species level (with the watermelon /bottle-gourd manipulation), were used to evaluate the legitimacy of the holobiont concept.

### **A non-random recruitment of the root endosphere microbiota**

A sophisticated experimental design including different models of ungrafted and grafted plants was developed and set up to evaluate the holobiont concept (Figure 1). The first hypothesis stating that the pattern of recruitment is only passive was invalidated. Consequently, the holobiont concept and hologenome theory applied to plants remains valid. Independent analyses of the root-endospheric microbiota demonstrated differentiation among the microbial communities that colonized the roots in the two experimental systems (Figure 2 & S3). Hypothesis 2 was thus validated. These results confirm both previous and very recent studies. For instance, a greenhouse bioassay showed clear modifications in root microbial community structure depending on the identity of the plant species (*Baccharis pilularis*, *Ceanothus thyrsiflorus*, or *Pinus muricata*) (23). Host preference signatures of commensal bacterial communities of the root endosphere of two different plant species (*Lotus japonicus*, *Arabidopsis thaliana*) were demonstrated in greenhouse experiments and synthetic communities (SynCom) specific to each plant species (24). Further evidence of host-plant preference effects was obtained using different mixes of neighboring plant species (25, 26).

Chimeric plants were used for in-depth assessment of the randomness of the microbiota composition by comparing ungrafted relatives. If the microbiota of A differs from B as demonstrated here in the two experimental systems, and if holobionts can consistently be units of selection, grafting A/B and B/A are expected to be similar and close to A and B if the molecules produced by A and B determine the microbiota community composition. Our results support this interpretation of the consequence of considering plants as holobionts and also provide information concerning the drivers of root-microbiota composition. Far from negligible determinism in the microbiota assembly of grafted plants was demonstrated across all the experiments (Figure 3, Figure S4) supporting the hypothesis that plants should be considered as holobiont objects in an evolutionary perspective.

### **Rootstock as the main driver of the root endosphere microbial communities in chimeric plants**

The determinism in the root endosphere microbiota recruitment in the chimeric plant between rootstock and scion was uneven. The type of rootstock was the main driver of the root endosphere microbial community composition (Figure 2 & 3). The dominance of the rootstock over the scion in the recruitment of the root microbiota did not depend on the plant-genotype used (e.g. 101C versus C101 conditions showed similar trends with the rootstock shaping root microbiota, Figures 3 and 4) and was strikingly observed in reciprocal grafts. Previous studies on grafted plants also emphasized the dominant role of the rootstock (22, 27–29) over the scion in determining microbiota assemblages. However, root endosphere microbiota have been overlooked so far despite the importance of these microorganisms in plant functioning (e.g. 14, 30, 31). The triggering effect for selective recruitment of root-associated microbiota is likely conferred by root secretions. Although the carbon skeleton of the secreted molecules is synthesized by photosynthesis (i.e. by the scion), the root traits determine the quantity and quality of root secretions, which can be changed or made more elaborate according to the origin of the root. This may explain why active recruitment is dominated by the rootstock.

**Unless similar plant-genetic materials are used in reciprocal grafting, different root endospheric microbiota are observed**

Our experimental results clearly demonstrate differentiation of the bacterial endosphere communities among the reciprocal grafted plants (Figure 2). Thus validating hypothesis 3, a different microbiota in A/B and B/A based on the assumption of induced perturbation of the signaling molecules. The difference in the endospheric microbiota between A/B and B/A was observed repeatedly across the two experiments. The effect of the scion on the determinist recruitment was also significant but was not as strong as that of the rootstock (Figures 2 and 3). Considering that the largest fraction of the root endosphere microbiota originates from the rhizosphere (32, 33), it is likely that signal molecules emitted outside the roots in the form of exudates are synthesized in the roots themselves and to a lesser extent in the shoot, and/or the recognition signals of a given microorganism permitting the root endosphere colonization are controlled by the roots.

Plants are known to synthesize secondary metabolites they emit at the level of the roots, including coumarins (34), glucosinolates (35), benzoxazinoids (36), triterpenes (37, 38), as well as other less complex compounds such as citric acid, malic acid, succinic acid that have regulatory effects on root colonization, nutrient acquisition and root volume (39). In addition to these compounds, miRNA emitted outside the roots can mediate the plant-microorganism interactions (40).

According to the literature, the succession in the composition of the microbiota observed over time in the grapevine experiment, also seems to be correlated with a modification in secondary metabolites in the roots (41). Intuitively, one can interpret these changes as being under the intrinsic control of the plant itself and to depend on the plant's physiological needs and stage of growth. However, it has also been documented that the endospheric microbiota of the plant and its composition reprogram the

metabolic pathways, thereby changing the composition of the primary and secondary metabolites produced by the host plant (42). The microbiota is therefore hypothesized to influence its own succession. To summarize, the determinism of the root endosphere microbiota composition could be under the control of the host-plant and components of its microbiota, hence under the control of the plant holobiont.

## Conclusions and prospects

Our experiments demonstrated that the holobiont concept cannot be rejected, nor can the hypothesis of plant holobionts as units of selection.

Because the holobiont concept deeply modifies our perception of individuality for a macro-organism including animals and notable, plants, not solely from a philosophical but also from a scientific point of view, this paper calls for further evaluation of the holobiont concept and for the identification of the limits of the hologenome theory using hypothesis driven research in the different coevolutionary dimensions. Our work also calls for elucidation of the mechanistic processes behind the determinism of microbiota recruitment, filtering, and assembly. Holobiont and hologenome research is still in its infancy. Plants are probably the best organisms to test hypotheses related to the holobiont concept because they are easier to use than animals if the composition of the microbiota has to be manipulated. For instance, gnotobiotic strategies where a plant is inoculated by a synthetic community have been successfully developed mainly using *Arabidopsis thaliana* (e.g. 43, 44). One important avenue of research would be to investigate how particular compounds produced by a host plant, by components of the microbiota, or by both, can shape and change the microbiota and hence modify holobiont functioning.

We anticipate a new understanding of coevolution between host and microorganisms and also among microorganisms, with possible impacts on the future of plant- and health-science stimulated by future holobiont- and hologenome-based research.

## Materials and Methods

### Biological model and experimental design

To test our hypotheses, we set up an equivalent experimental scheme (Figure 1) on two biological models traditionally used as grafted plants: grapevine (France) and watermelon grafted with bottle-gourd (China). Watermelon (*Citrullus lanatus*) (W) and the bottle-gourd (*Lagenaria siceraria*) (B) are both annual plants whereas grapevine, including the Chenin grapevine (*Vitis vinifera*) (C), the American “wild” hybrid grapevine (101.14 Millardet et de Grasset - *Vitis rupestris* x *Vitis riparia*) (101) and the Fercal grapevine (*Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* x *Vitis longii*) (F) are perennial ligneous plants. Figure 1 summarizes the experimental design and details of the different combinations of grafting are provided at the beginning of the results section. We split the two genotype rootstock

conditions into two separate sub-experiments: 101-14 / Chenin (experiment 1) and Fercal / Chenin (experiment 2). The watermelons were grown in a greenhouse using soil collected from Jiangsu Province in China. The grapevines, produced by Pépinière de Salettes (France) were grown outdoors (Saint-Geours-de-Maremne, France).

### **Root sampling, DNA extraction**

For each condition, we sampled the roots of 15 replicates 65 days after grafting in the watermelon/bottle-gourd model (1 sampling time (T1) for the annual plants) and 6 and 18 months after grafting (2 sampling times (T1 and T2) for the perennial plant) in the grapevine model (Figure 1). Roots were sampled, sorted, and placed individually in hermetic bags and in coolers for transport to the laboratory. Because of the differences in root structure and toughness of the two biological models, the washing steps were different. The grapevine roots were first fully washed in tap water, then immersed in a 5‰ Triton X100 solution for 10 minutes (a stronger washing step because the roots are slightly lignified) and finally thoroughly rinsed several times in sterile ultra-pure water. The watermelon roots were surface sterilized with 70% ethanol for 1 min and then immersed in 2% sodium hypochlorite for 3 min. The watermelon roots were then washed in 70% ethanol for 30 seconds and rinsed five times in sterile ultra-pure water. All the roots of similar diameters were collected in different places to obtain a representative sample of the rooting system. After cleaning, the roots were placed in sterile micro-tubes and stored at -80 °C until DNA processing.

Total watermelon root DNA was extracted from 0.25g of homogenized root tissue sample using the DNeasy PowerSoil® DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Total grapevine-root DNA was extracted and quantified by the GENTYANE platform (Clermont-Ferrand, France) using magnetic bead technology (Sbeadex) on an Oktopure LGC Genomics automat, using Hoechst 33258 reagent, and a Tecan Infinite 1000 instrument. All the DNAs were then stored at -20 °C until amplicon production.

### **16S rRNA gene sequencing**

All the DNAs were normalized at 10ng/ul to guarantee equivalent amplification of all the samples. Based on previous optimization experiments, endophytic bacteria were analyzed from PCR amplification of the V5–V7 hypervariable region of the bacterial 16S rRNA gene using the primer pairs 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3') and 1223R (5'-CCATTGTAGTACGTGTGTA-3') (18). Paired-end (2×250 cycles) sequencing was performed on the Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) by Sangon Biotech Co., Ltd for the watermelon experiment and by the EcogenO platform (Rennes, France) for the grapevine experiments.

### **Raw data processing and affiliation**

Raw reads were processed using USEARCH (45). First, paired ends were merged using USEARCH `fastq_mergepairs` command (`fastq_maxdiffs = 2`, with the maximum number of mismatches in the alignment set at 2 bp), and were then truncated to 410 bp (USEARCH `fastq_filter: fastq_trunclen = 410`, `fastq_maxee = 0.01`). Only the remaining quality-filtered sequences were used to find the set of unique sequences (USEARCH `fastx_uniques`). Unique sequences were then denoised using the UNOISE algorithm (46), which both corrects errors and removes chimeras (USEARCH `unoise3: unoise_alpha = 2` and `minsize = 200`), to obtain a more restricted list of zero-radius operational taxonomic units (zOTUs) (100% identity) (46). A taxonomic classification of each zOTU was performed using the RDP classifier with a minimum bootstrap threshold of 80% on the whole fragment. A few zOTUs assigned to Archaea or chloroplasts were detected and removed from the datasets. To obtain an equivalent sequencing depth for each plant species for downstream analyses, the watermelon samples and the grapevine samples were always analysed independently and rarefied to 31 000 and 10 000 sequences with the `otutab_rare` command in USEARCH respectively and a check was performed to be sure that all curve slopes asymptotically converged to the plateau (Figure S6). The watermelon and the grapevine contingency tables contained 808 and 958 bacterial zOTUs, respectively.

### Statistical analyses

#### *Description of bacterial communities*

The Chao1 index and richness of each bacterial community were calculated using the `alpha_div` command in USEARCH. Kruskal–Wallis tests followed by Wilcoxon tests for pairwise comparisons of bacterial diversity (small letters on the graphs indicate significant differences). The p values were corrected for the false discovery rate in multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) (47). The principal coordinate analysis (PCoA) was used to analyze the  $\beta$ -diversity of the bacterial communities between samples based on the Euclidean distance matrix with Hellinger transformation using the “ape” and “Vegan” packages in R. A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with the “Adonis” function on the distance matrices was used to evaluate the effects of the rootstock and scion on root endospheric microbiota.

#### *Neutral community model and source tracking*

To determine the potential importance of stochastic processes for community assembly, we used the Sloan Neutral Community Model (NCM) to predict the relationship between the frequency with which taxa occur in a set of local communities (in this case in the bacterial community of an individual grafted plant root) and their abundance across the wider metacommunity (the community of both the ungrafted plants of the scion and of the rootstock) (48). This model evaluates whether the microbial assembly from a metacommunity follows a neutral model or a niche-based process as a function of the metacommunity log abundance. In this model,  $m$  is an estimate of dispersal between communities. The

fitting of this parameter was performed in R using non-linear least-squares fitting and the `minpack.lm` package (49). The 95% confidence interval around all fitting statistics was calculated by bootstrapping with 1 000 replicates. The taxa were subsequently separated into three fractions depending on whether they occurred more frequently than (above fraction), less frequently than (below fraction), or within the 95% confidence interval of the NCM predictions (neutrality interval). To analyze deviations from the NCM predictions, we compared the composition and estimated the migration rate ( $m$ ) of the neutral and non-neutral (above and below) fractions of the bacterial communities. All computations were performed in R (version 4.0.2). The R code used for this analysis originated from (50).

From the Sloan model, we extracted the taxa of grafted roots communities that occurred more frequently than the 95% confidence interval (the above fraction) of the NCM predictions. The taxa of the above fraction were then used to construct the phylogenetic tree using the Interactive Tree of Life (iTOL) (51). In addition, the taxa of the above fraction were extracted and used for source tracker analysis. Here, the taxa of the above fraction in the grafted condition were called sink and the ungrafted plants bacterial community were called source. The Bayesian-based SourceTracker (52) was used to quantify the extent of the contribution of potential ungrafted plants root community source to the chosen grafted plants root community sink.

## References

1. J. J. Morris, What is the hologenome concept of evolution? *F1000Research* **7**, 1664 (2018).
2. R. Mendes, P. Garbeva, J. M. Raaijmakers, The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 634–663 (2013).
3. E. Rosenberg, G. Sharon, I. Atad, I. Zilber-Rosenberg, The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms: Evolution via symbiosis. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**, 500–506 (2010).
4. L. V. Blanton, *et al.*, Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science* **351**, aad3311–aad3311 (2016).
5. P. Vandenkoornhuyse, A. Quaiser, M. Duhamel, A. Le Van, A. Dufresne, The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* **206**, 1196–1206 (2015).
6. N. Vannier, C. Mony, A.-K. Bittebière, P. Vandenkoornhuyse, Epigenetic Mechanisms and Microbiota as a Toolbox for Plant Phenotypic Adjustment to Environment. *Front. Plant Sci.* **6** (2015).
7. S. M. Scheiner. Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**, 35-68 (1993)
8. E. Rosenberg, G. Sharon, I. Zilber-Rosenberg, The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environ. Microbiol.* **11**, 2959–2962 (2009).
9. I. Zilber-Rosenberg, E. Rosenberg, Microbial-driven genetic variation in holobionts. *FEMS Microbiol. Rev.*, fuab022 (2021).
10. I. Zilber-Rosenberg, E. Rosenberg, Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 723–735 (2008).
11. I. Zilber-Rosenberg, E. Rosenberg, Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 723–735 (2008).
12. S. R. Bordenstein, K. R. Theis, Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLOS Biol.* **13**, e1002226 (2015).
13. K. R. Theis, *et al.*, Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *mSystems* **1** (2016).
14. S. Compant, A. Samad, H. Faist, A. Sessitsch, A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J. Adv. Res.* **19**, 29–37 (2019).
15. P. Trivedi, J. E. Leach, S. G. Tringe, T. Sa, B. K. Singh, Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 607–621 (2020).
16. D. S. Lundberg, *et al.*, Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**, 86–90 (2012).
17. D. Bulgarelli, *et al.*, Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**, 91–95 (2012).
18. A. Lê Van, *et al.*, Ecophylogeny of the endospheric root fungal microbiome of co-occurring *Agrostis stolonifera*. *PeerJ* **5**, e3454 (2017).
19. N. Vannier, *et al.*, A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome* **6**, 79 (2018).



20. D. A. Baltrus, Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **38**, 109–116 (2017).
21. A. Frank, J. Saldierna Guzmán, J. Shay, Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms* **5**, 70 (2017).
22. R. Marasco, E. Rolli, M. Fusi, G. Michoud, D. Daffonchio, Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome* **6**, 3 (2018).
23. M. Duhamel, *et al.*, “Keystone mutualists can facilitate transition between alternative ecosystem states in the soil” (*Ecology*, 2018) <https://doi.org/10.1101/392993> (September 8, 2021).
24. K. Wipfel, *et al.*, Host preference and invasiveness of commensal bacteria in the Lotus and Arabidopsis root microbiota. *Nat. Microbiol.* **6**, 1150–1162 (2021).
25. N. Vannier, A.-K. Bittebiere, C. Mony, P. Vandenkoornhuys, Root endophytic fungi impact host plant biomass and respond to plant composition at varying spatio-temporal scales. *Fungal Ecol.* **44**, 100907 (2020).
26. C. Mony, V. Gaudu, C. Ricono, O. Jambon, P. Vandenkoornhuys, Plant neighbours shape fungal assemblages associated with plant roots: A new understanding of niche-partitioning in plant communities. *Funct. Ecol.* **35**, 1768–1782 (2021).
27. F. D’Amico, *et al.*, The Rootstock Regulates Microbiome Diversity in Root and Rhizosphere Compartments of Vitis vinifera Cultivar Lambrusco. *Front. Microbiol.* **9**, 2240 (2018).
28. Y. Ruan, T. Wang, S. Guo, N. Ling, Q. Shen, Plant Grafting Shapes Complexity and Co-occurrence of Rhizobacterial Assemblages. *Microb. Ecol.* **80**, 643–655 (2020).
29. H. Toju, K. Okayasu, M. Notaguchi, Leaf-associated microbiomes of grafted tomato plants. *Sci. Rep.* **9**, 1787 (2019).
30. D. B. Müller, C. Vogel, Y. Bai, J. A. Vorholt, The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu. Rev. Genet.* **50**, 211–234 (2016).
31. S. Compant, *et al.*, The plant endosphere world – bacterial life within plants. *Environ. Microbiol.* **23**, 1812–1829 (2021).
32. C. Xiong, *et al.*, Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity. *New Phytol.* **229**, 1091–1104 (2021).
33. J. Guo, *et al.*, Seed-borne, endospheric and rhizospheric core microbiota as predictors of plant functional traits across rice cultivars are dominated by deterministic processes. *New Phytol.* **230**, 2047–2060 (2021).
34. M. J. E. E. Voges, Y. Bai, P. Schulze-Lefert, E. S. Sattely, Plant-derived coumarins shape the composition of an Arabidopsis synthetic root microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 12558–12565 (2019).
35. U. Lahrman, *et al.*, Mutualistic root endophytism is not associated with the reduction of saprotrophic traits and requires a noncompromised plant innate immunity. *New Phytol.* **207**, 841–857 (2015).
36. T. E. A. Cotton, *et al.*, Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME J.* **13**, 1647–1658 (2019).
37. A. C. Huang, *et al.*, A specialized metabolic network selectively modulates Arabidopsis root microbiota. *Science* **364**, eaau6389 (2019).

38. R. P. Jacoby, L. Chen, M. Schwier, A. Koprivova, S. Kopriva, Recent advances in the role of plant metabolites in shaping the root microbiome. *F1000Research* **9**, 151 (2020).
39. M. Noman, *et al.*, Plant–Microbiome Crosstalk: Dawning from Composition and Assembly of Microbial Community to Improvement of Disease Resilience in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6852 (2021).
40. H. Middleton, É. Yergeau, C. Monard, J.-P. Combier, A. El Amrani, Rhizospheric Plant–Microbe Interactions: miRNAs as a Key Mediator. *Trends Plant Sci.* **26**, 132–141 (2021).
41. H. Dang, *et al.*, Succession of endophytic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi associated with the growth of plant and their correlation with secondary metabolites in the roots of plants. *BMC Plant Biol.* **21**, 165 (2021).
42. S. Kaur, V. Suseela, Unraveling Arbuscular Mycorrhiza-Induced Changes in Plant Primary and Secondary Metabolome. *Metabolites* **10**, 335 (2020).
43. J. M. Kremer, *et al.*, Peat-based gnotobiotic plant growth systems for Arabidopsis microbiome research. *Nat. Protoc.* **16**, 2450–2470 (2021).
44. S. Hou, *et al.*, A microbiota–root–shoot circuit favours Arabidopsis growth over defence under suboptimal light. *Nat. Plants* **7**, 1078–1092 (2021).
45. R. C. Edgar, Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461 (2010).
46. R. C. Edgar, “UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing” (Bioinformatics, 2016) <https://doi.org/10.1101/081257> (August 5, 2021).
47. W.S. Noble, How does multiple testing correction work? *Nat. Biotechnol.* **27**, 1135–1117 (2009).
48. W. T. Sloan, *et al.*, Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ. Microbiol.* **8**, 732–740 (2006).
49. Elzhov TV, Mullen KM, Spiess AN, Bolker B. minpack.lm: R interface to the Levenberg Marquardt nonlinear least-squares algorithm found in MINPACK, plus support for bounds. <http://CRAN.R-project.org/package=minpack.lm> R package version. 2016:11–7.
50. A. R. Burns, *et al.*, Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *ISME J.* **10**, 655–664 (2016).
51. I. Letunic, P. Bork, Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **49**, W293–W296 (2021).
52. D. Knights, *et al.*, Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat. Methods* **8**, 761–763 (2011).

## **Acknowledgements**

### **Watermelon - Bottlegourd**

This work was supported by a grant from the National Nature Science Foundation of China (31772398). We deeply acknowledge Dr. Dongsheng Wang from Nanjing Institution of Vegetable Science (China) for chimeric watermelon production.

### **Grapevine**

This work was supported by a grant from the CNRS-EC2CO program (HOLOBIONT project) and by the "Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie" (ANRT) through an industrial CIFRE agreement between Château Palmer, Château Latour, Sovivins, Pépinière de Salettes and the University of Rennes 1 (Agreement N° 2017/1579). We are grateful to Biogenouest, ANAEE-France, GENTYANE (<http://gentyane.clermont.inra.fr/>) and the EcogenO platform (<https://ecogeno.univ-rennes1.fr>) for help with DNA extraction and amplicon sequencing respectively. We deeply acknowledge Pépinière de Salettes (France) for chimeric grapevine production and experimental support (Thibaud de Salettes and Isabelle Omon).

### **Author contribution**

MB, TW, NL and PV conceived the project with the support and the expertise of KT and SB. MB, TW, CM, NL and PV set up the methodology of the study. MB and PV sampled the grapevine and TW sampled the watermelon. MB and TW conducted the lab experiments and analyzed the sequence data (with the help of XQ for data processing). MB and TW performed the statistical analyses with the help of CM, XQ and LL. MB, TW, PV wrote the first draft of the paper. All the authors contributed critically to interpreting the results and gave their final approval for publication.

Figures

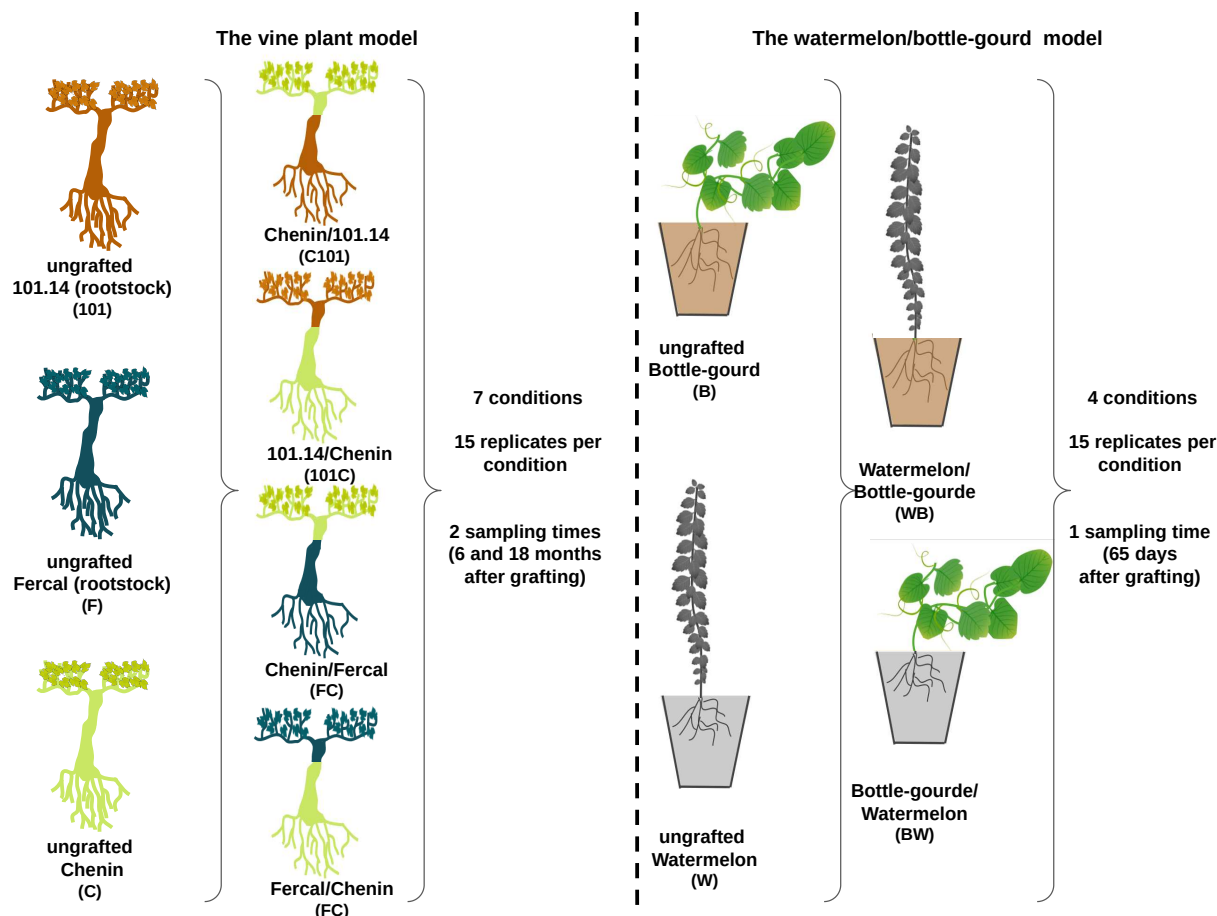
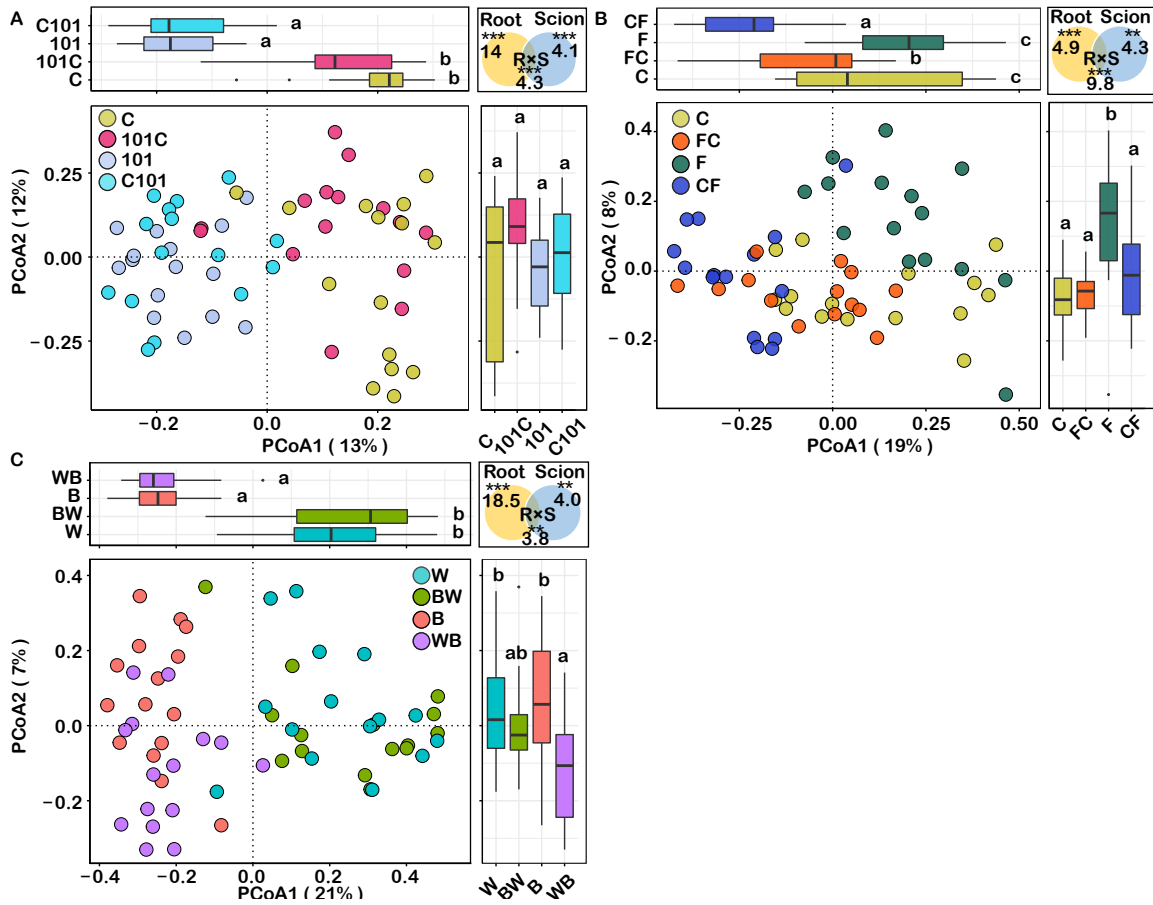


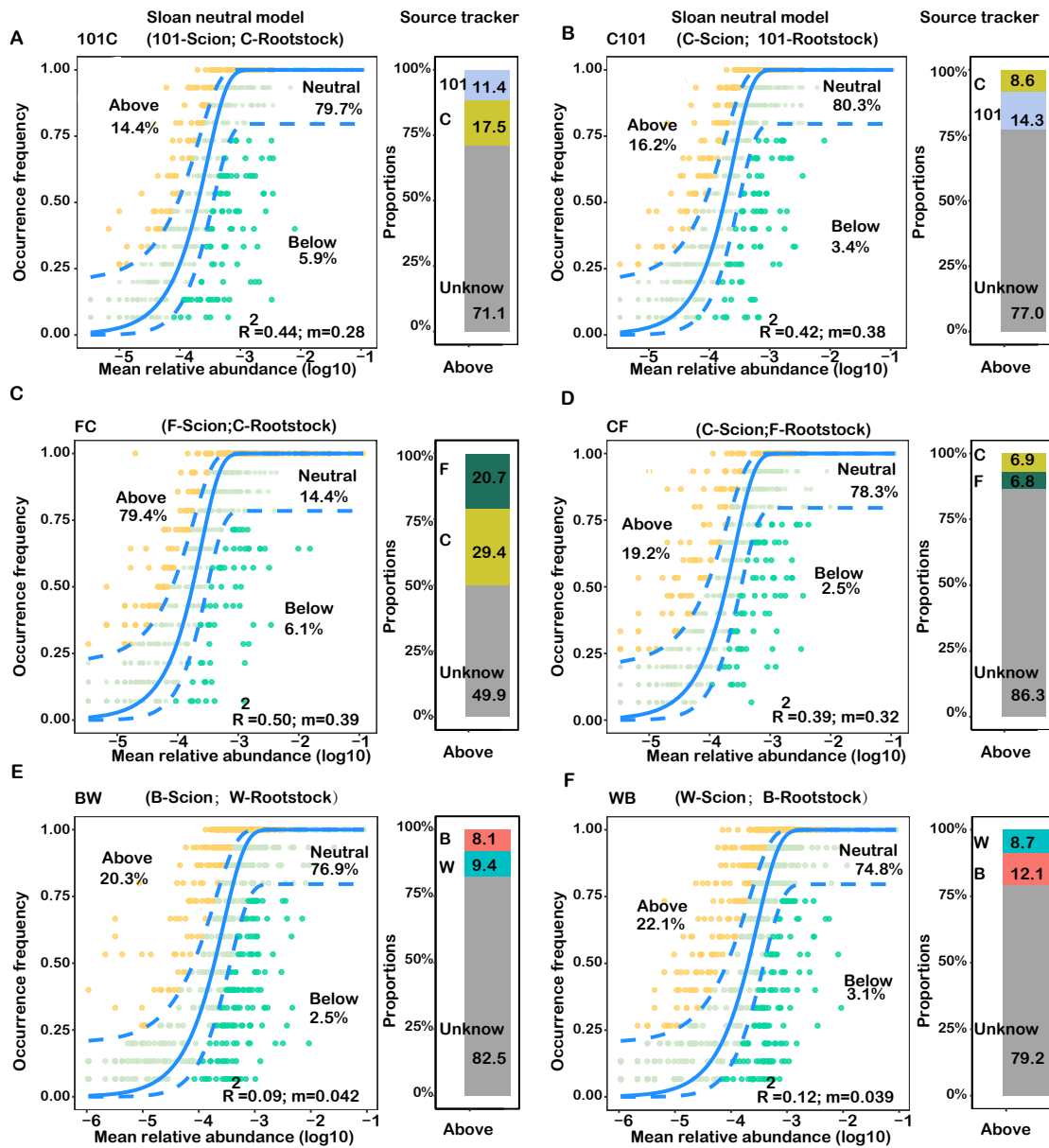
Figure 1: Experimental design and sampling scheme

This study comprised two biological models: grapevine (on the left) and watermelon/bottle-gourd (on the right). The grapevine model (perennial and ligneous plant) comprised two sub-experiments (101/C and F/C experiments) with four treatments: ungrafted 101 (usual 101.14 rootstock), ungrafted C (usual scion Chenin), grafted C101 (C: scion - S; 101: rootstock), grafted 101C (101: scion; C: rootstock) and ungrafted F (usual Fercal rootstock), ungrafted C (usual scion Chenin), grafted CF (C: scion; F: rootstock) and grafted FC (F: scion; C: rootstock). Roots of each condition (15 replicates) were collected on two occasions (6 and 18 months after grafting). The watermelon/bottle-gourd model (annual plant) comprised two ungrafted conditions: B (bottle-gourd), W (watermelon) and two grafted combinations: WB (W: scion; B: rootstock) and BW (B: scion; W: rootstock). Roots of each condition (15 replicates) were collected on one occasion (65 days after grafting).



**Figure 2: Bacterial community composition of the two models**

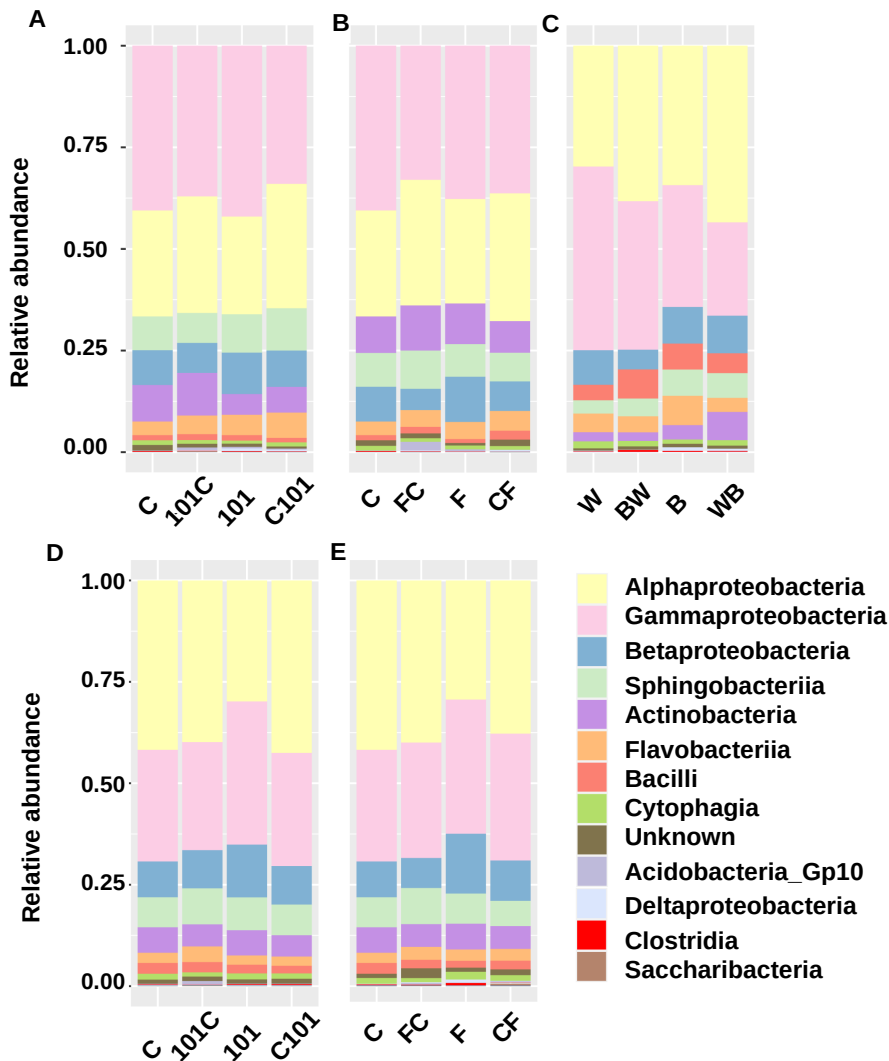
Principal coordinate analysis (PCoA) plots depict the Euclidean distance of the bacterial communities of the grapevine models: 101/C grapevine experiment and F/C grapevine experiment (A, B respectively) and the watermelon/bottle-gourd model (C) at T1 sampling time. Results of the sampling 18 months after grafting are provided in Figure S3. Results of the PERMANOVA statistics tests testing the effect of the rootstock (Root), the scion (Scion) and the interaction of the two variables (R<sup>2</sup>) (\*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001) and R<sup>2</sup>, percentage of each explained variance, are provided on the top right of each panel included in the plots. Box plots show the overall distribution of PC1 and PC2 scores within each condition. Small letters indicate significant differences between conditions (Tukey's test for multiple comparisons).



**Figure 3: Partitioning of deterministic and stochastic processes of bacterial community assembly and source tracker results**

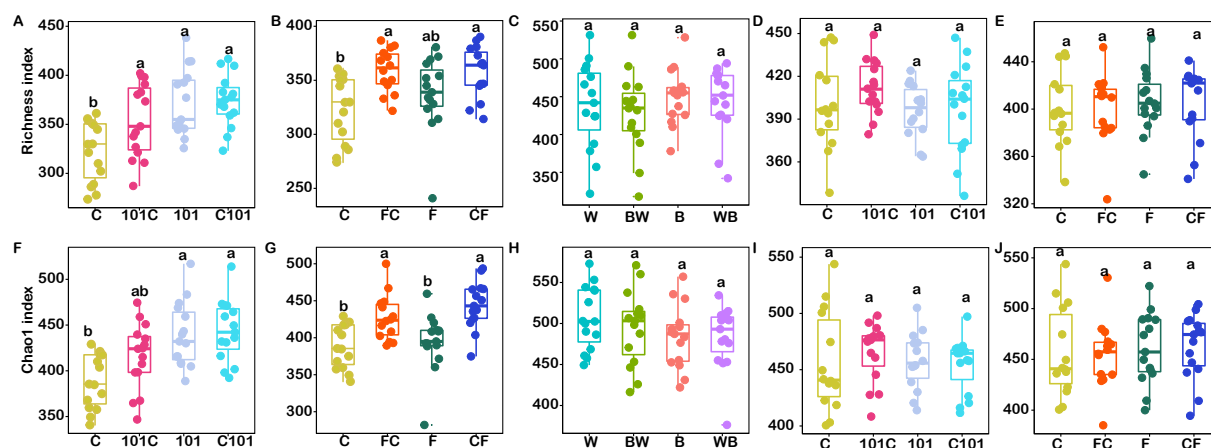
The first graphs (curves on the left) show the occurrence frequencies predicted by the neutral community model (NCM) at T1 sampling time. Results of sampling 18 months after grafting are provided in Figure S4. The taxa occurring more frequently than expected are shown as yellow dots while those occurring less frequently are in green. The solid blue line indicates the best fit of the model and the dashed lines indicate the 95% confidence intervals. The dashed lines indicate the neutrality envelope. Goodness of statistical fit  $R^2$  and  $m$  (i.e. migration rate) are both indicated on the graphs. Percentages on the graphs indicate cumulative taxa occurrence frequencies Above, Neutral and Below fractions. The second graphs (bar charts on the right) show the results of the source tracker analysis indicating origin proportions of the above partitions of the NCM. The ‘unknown’ status within the source tracker analysis is related to identical zOTUs found in both sources. For the below partitions of the NCM representing a low proportion of the abundances (i.e. from 2.5% in panels D and E, to up to 6.1% only in panel C) made it statistically impossible to do the same source tracker analysis.

Supplementary data



**Figure S1: Bacterial abundances of the two models**

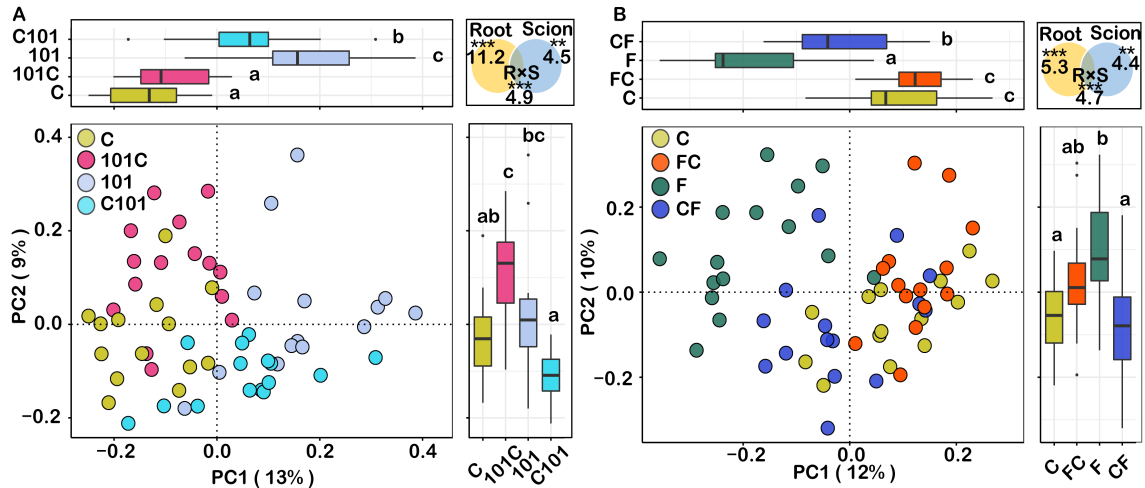
Relative abundances (frequencies) of each bacterial class of the root endosphere of the 101/C grapevine experiment (A & D for the T1 and T2 respectively); of the F/C grapevine experiment (B & E for the T1 and T2 respectively) and of the Watermelon/Bottle-gourd experiment (C) (overall microbiota composition). C: ungrafted Chenin, 101C: 101.14 grafted on Chenin, 101: ungrafted 101.14, C101: Chenin grafted on 101.14, FC: Fercal grafted on Chenin, F: ungrafted Fercal, CF: Chenin grafted on Fercal, W: ungrafted Watermelon, BW: Bottle-gourd grafted on Watermelon, B: ungrafted Bottle-gourd, WB: Watermelon grafted on Bottle-gourd.



**Figure S2: Bacterial richness and Chao1 index of the two models**

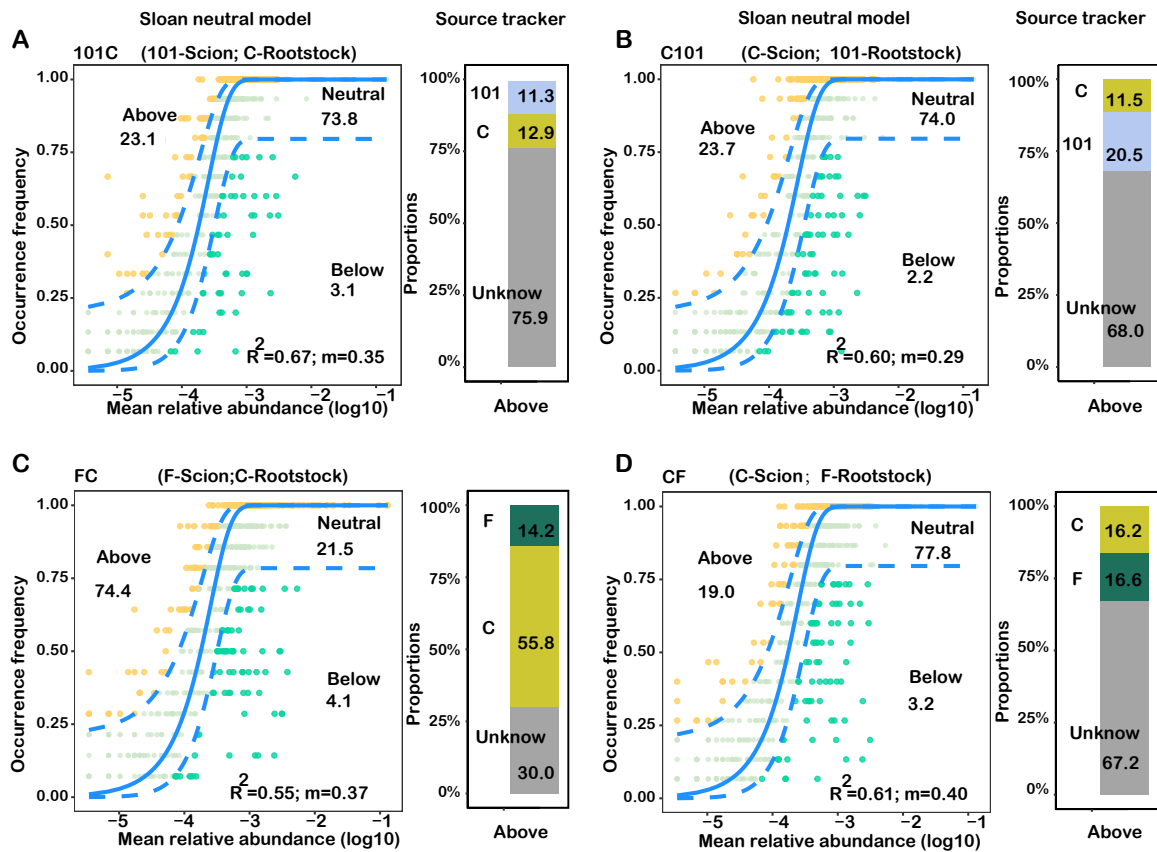
Bacterial richness and Chao1 index of the root endosphere of the grapevine model and the watermelon/bottle-gourd model. Graphs represent the richness and the Chao1 index of the 101/C grapevine experiment (A & F ; D & I for the T1 and T2 respectively); of the F/C grapevine experiment (B & G ; E & J for the T1 and T2 respectively) and of the Watermelon/Bottle-gourd experiment (C & H respectively). Small letters indicate significant differences (Kruskal–Wallis test followed by a Wilcoxon test for pairwise comparisons - p values corrections using the Benjamini–Hochberg false discovery rate) between conditions. C: ungrafted Chenin, 101C: 101.14 grafted on Chenin, 101: ungrafted 101.14, C101: Chenin grafted on 101.14, FC : Fercal grafted on Chenin, F: ungrafted Fercal, CF: Chenin grafted on Fercal, W: ungrafted Watermelon, BW: Bottle-gourd grafted on Watermelon, B: ungrafted Bottle-gourd, WB: Watermelon grafted on Bottle-gourd.





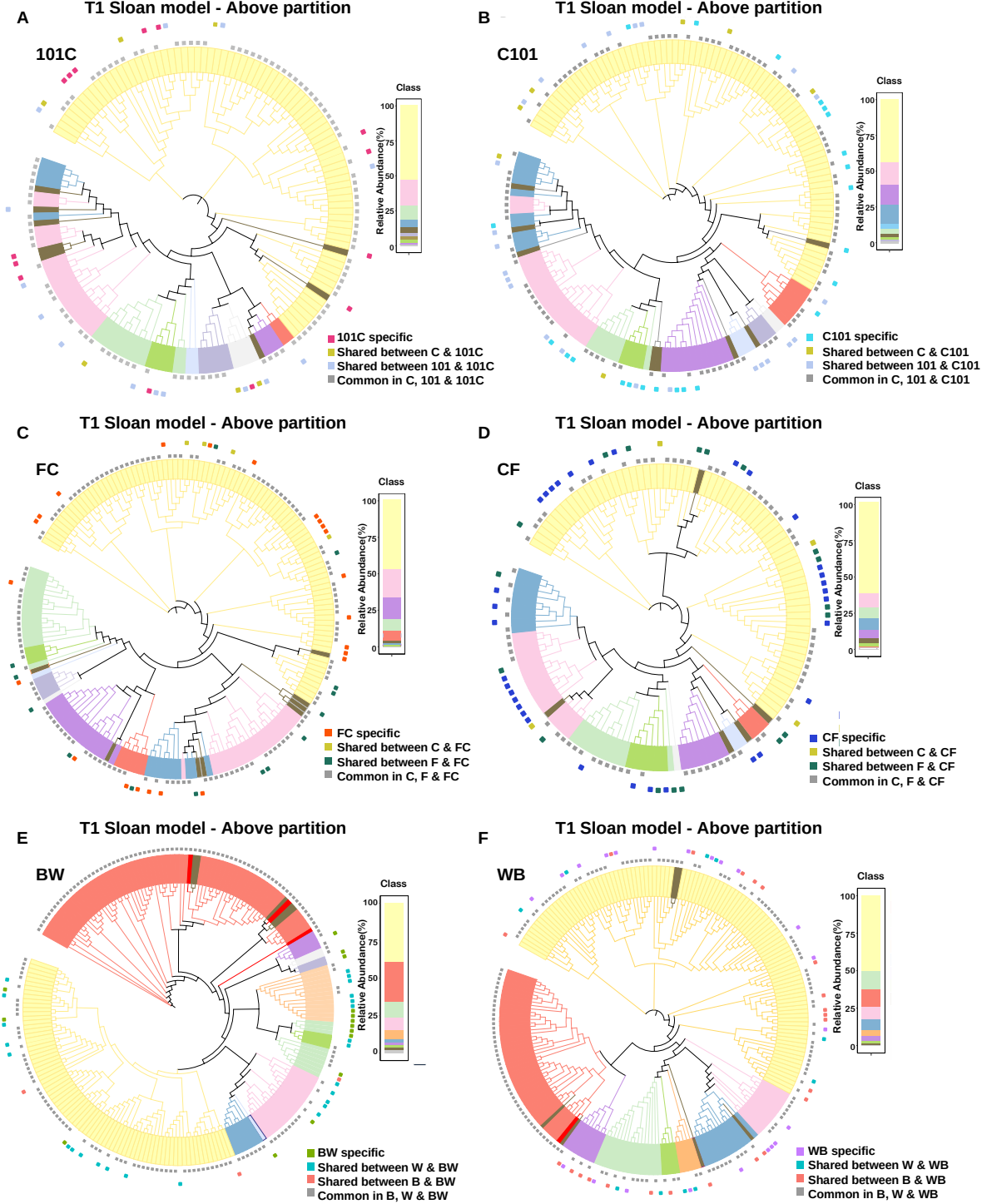
**Figure S3: Bacterial community composition of the grapevine models on the second sampling occasion (T2)**

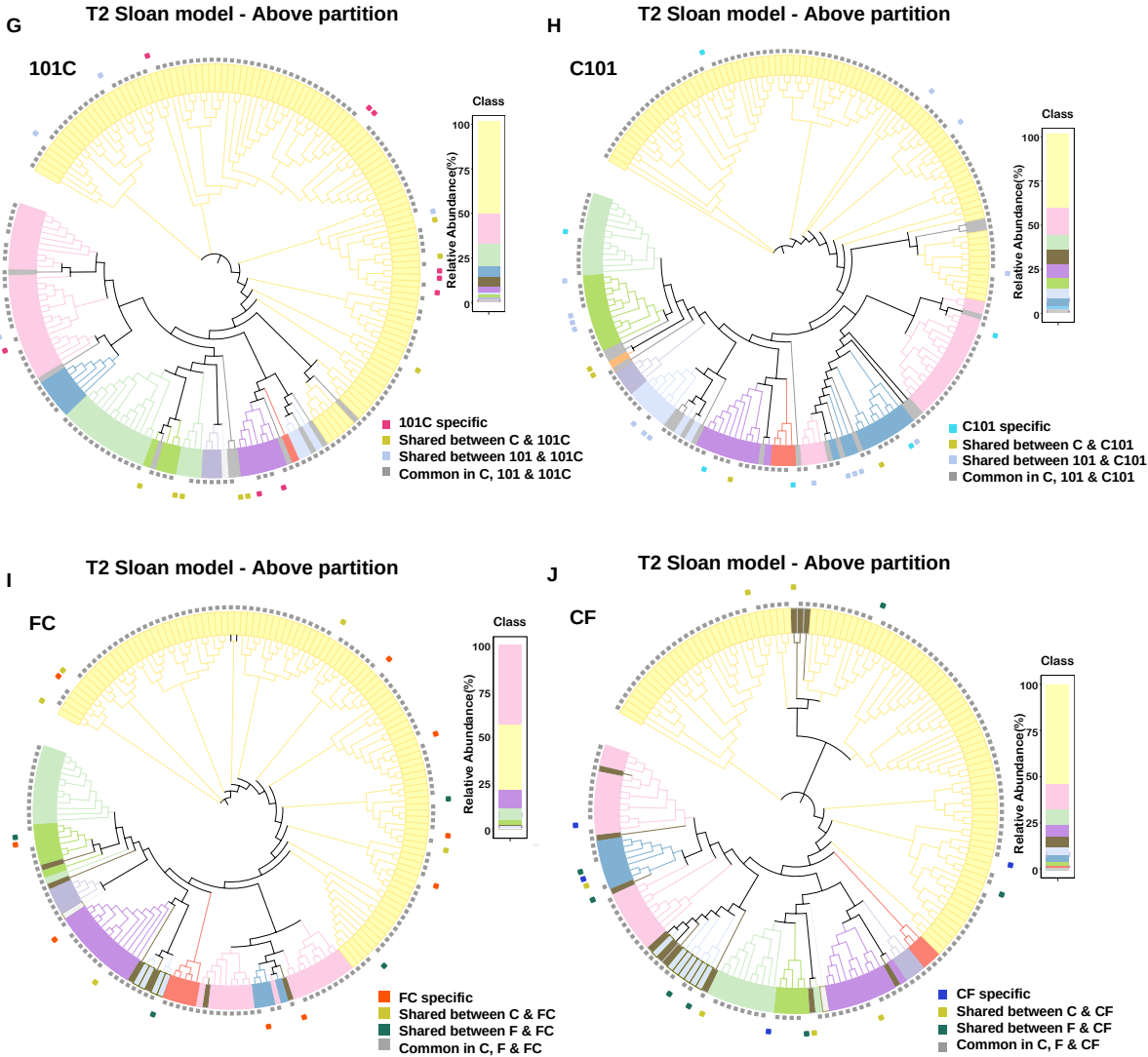
Principal coordinate analysis (PCoA) plots depict the Euclidean distance of the bacterial communities of the grapevine models: 101/C grapevine experiment and F/C grapevine experiment (A, B respectively) for the T2 sampling time. Results from the Permanova tests testing the effect of the rootstock (Root), the scion (Scion) and the interaction between the two variables (R:S) (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ) and  $R^2$ , percentage of each explained variance, are included on the plots. Box plots showing the overall distribution of PC1 and PC2 scores within each condition. Small letters indicate significant differences between conditions (Tukey's test for multiple comparisons). C is ungrafted Chenin, 101C is 101.14 grafted on Chenin, 101 is ungrafted 101.14, C101 is Chenin grafted on 101.14, FC is Fercal grafted on Chenin, F is ungrafted Fercal, CF is Chenin grafted on Fercal.



**Figure S4: Partitioning of deterministic and stochastic processes of bacterial community assembly and source tracker results of the grapevine models at T2**

The first graphs (curves on the left) show the occurrence frequencies predicted by the neutral community model (NCM). The taxa occurring more frequently than expected are shown as yellow dots while the taxa occurring less frequently are in green. The solid blue line indicates the best fit of the model and the dashed lines indicate 95% confidence intervals. The dashed lines represent the neutrality envelope. “m” (estimate rate) and  $R^2$  ( $0 < R^2 \leq 1$ , adequacy of the model fit) are indicated on the graphs. The percentages on the graphs indicated cumulative taxa occurrence frequencies of the Above, Neutral and Below fractions. The second graphs (bar charts on the right) show the results of the source tracker analysis indicating the origin proportions of the above partitions of the NCM. C is ungrafted Chenin, 101C is 101.14 grafted on Chenin, 101 is ungrafted 101.14, C101 is Chenin grafted on 101.14, FC is Fercal grafted on Chenin, F is ungrafted Fercal, CF is Chenin grafted on Fercal. Panel A, B, C and D are 101C, C101, FC and CF respectively.





K (see the table in the next page)

Class legend				
Alphaproteobacteria	Sphingobacteriia	Bacilli	Acidobacteria	Chlamydia
Gammaproteobacteria	Actinobacteria	Cytophagia	Deltaproteobacteria	
Betaproteobacteria	Flavobacteriia	Unknown	Clostridia	

**K**

<b>Taxa (genus level)</b>	<b>Grafted only</b>	<b>Shared between grafted and ungrafted rootstocks</b>	<b>Shared between grafted and ungrafted scions</b>
<b>Condition</b>			
<b>101C (T1)</b>	<b>Specific to 101C</b>	<b>Shared between C and 101C</b>	<b>Shared between 101 and 101C</b>
	Caulobacter	Novosphingobium	Novosphingobium
	Bosea	Parachlamydia	Hyphomicrobium
	Azorhizobium	Labrys	Tumebacillus
	Neochlamydia	+ 3 unknown	Neochlamydia
	+ 10 unknown		Stenotrophomonas
			+ 9 unknown
<b>C101 (T1)</b>	<b>Specific to C101</b>	<b>Shared between C and C101</b>	<b>Shared between 101 and C101</b>
	2 Rhizobium	Labrys	Bradyrhizobium
	Caulobacter	Pedomicrobium	Novosphingobium
	Dongia	+ 5 unknown	Tumebacillus
	Paenibacillus		Neochlamydia
	3 Streptomyces		Nannocystis
	Mucilaginibacter		Lysobacter
	2 Pseudomonas		Streptomyces
	+ 12 unknown		+ 16 unknown
<b>FC (T1)</b>	<b>Specific to FC</b>	<b>Shared between C and FC</b>	<b>Shared between F and FC</b>

Chapitre 2 -Concept d'holobionte et microbiote de plantes chimériques

	Nannocystis	Pedomicrobium	Streptomyces
	Streptomyces	+ 3 unknown	Tumebacillus
	Bacillus		Lysobacter
	Paenibacillus		Dongia
	Delftia		Novosphingobium
	2 Devosia		+ 9 unknown
	Bosea		
	2 Caulobacter		
	Hyphomicrobium		
	Ensifer		
	Chitinophaga		
	+ 10 unknown		
<b>CF (T1)</b>	<b>Specific to CF</b>	<b>Shared between C and CF</b>	<b>Shared between F and CF</b>
	5 Rhizobium	Bradyrhizobium	2 Rhizobium
	Bosea	+3 unknown	Novosphingobium
	2 Devosia		Dongia
	Caulobacter		Lysobacter
	Asticcacaulis		Mucilaginibacter
	3 Pseudomonas		Neochlamydia
	Acinetobacter		Tumebacillus

	Chitinophaga		+11 unknown
	+20 unknown		
<b>WB</b>	<b>Specific to WB</b>	<b>Shared between W and WB</b>	<b>Shared between B and WB</b>
	Sphingomonas	2 Novosphingobium	Novosphingobium
	2 Rhizobium	Hyphomicrobium	Sphingopyxis
	Devosia	Mesorhizobium	Asticcacaulis
	Ochrobactrum	Taibaiella	Brevundimonas
	Rhizobium	2 Flavobacterium	Caulobacter
	Labrys	+3 unknown	Phenylobacterium
	2 Bradyrhizobium		2 Rhizobium
	2 Hyphomicrobium		Bradyrhizobium
	Streptomyces		3 Streptomyces
	Terrimonas		Chitinophaga
	Flavobacterium		Dyadobacter
	Aquicella		Niastella
	+8 unknown		+8 unknown
<b>BW</b>	<b>Specific to BW</b>	<b>Shared between W and BW</b>	<b>Shared between B and BW</b>
	Hyphomicrobium	2 Hyphomicrobium	Phenylobacterium
	Terrimonas	2 Devosia	Niastella
	3 Sphingobacterium	Amaricoccus	unknown

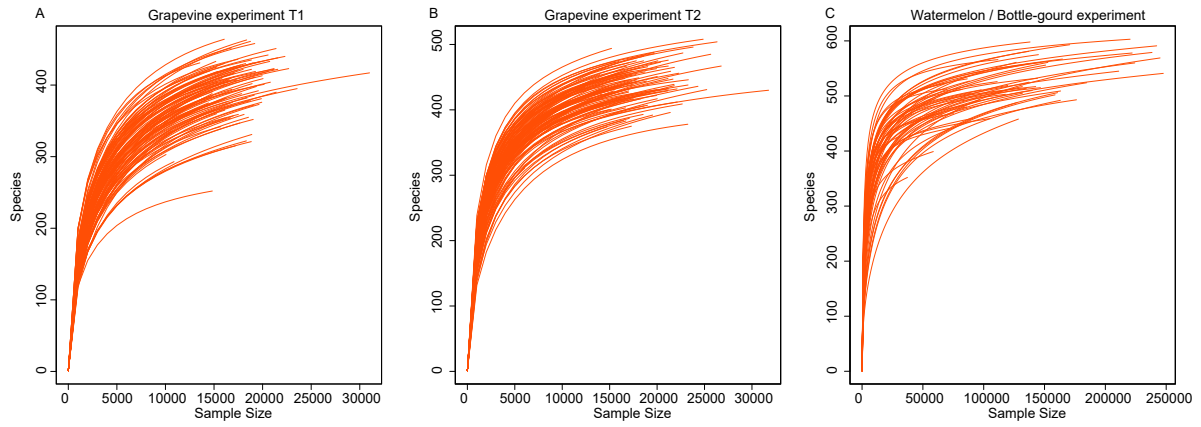
	3 Flavobacterium	Mesorhizobium	
	Streptomyces	Novosphingobium	
	+6 unknown	Pseudomonas	
		Rheinheimera	
		Algoriphagus	
		5 Flavobacterium	
		+7 unknown	
<b>101C (T2)</b>	<b>Specific to 101C</b>	<b>Shared between C and 101C</b>	<b>Shared between 101 and 101C</b>
	Rhizobium	Asticcacaulis	Devosia
	2 Bosea	Rhizobium	Pseudoxanthomonas
	3Caulobacter	Streptomyces	+2 unknown
	2 Streptomyces	2 Mucilaginibacter	
	Stenotrophomonas	+4 unknown	
	Aquicella		
	Cellvibrio		
<b>C101 (T2)</b>	<b>Specific to C101</b>	<b>Shared between C and C101</b>	<b>Shared between 101 and C101</b>
	Bosea	Streptomyces	Devosia
	Aquicella	Flavobacterium	Dongia
	Acidovorax	+2 unknown	Nannocystis
	Streptomyces		+12 unknown



	+2 unknown		
<b>FC (T2)</b>	<b>Specific to FC</b>	<b>Shared between C and FC</b>	<b>Shared between F and FC</b>
	Bosea	Bosea	Dongia
	Novosphingobium	Streptomyces	+3 unknown
	Hyphomicrobium	+3 unknown	
	Caulobacter		
	Devosia		
	Aquicella		
	Streptomyces		
	+2 unknown		
<b>CF (T2)</b>	<b>Specific to CF</b>	<b>Shared between C and CF</b>	<b>Shared between F and CF</b>
	Aquicella	Streptomyces	Nannocystis
	+3 unknown	Hyphomicrobium	Dongia
		+ 4 unknown	+ 5 unknown

**Figure S5: Phylogenetic tree of the above partition taxa in grafted condition predicted by the Sloan model.**

Phylogenetic tree (on the left) in which the inner band and tree branch show genera colored according to their class level. The outer square shows all the predicted above taxa represented only in the grafted condition, shared between the grafted and ungrafted rootstock conditions, shared between the grafted and ungrafted scion conditions, common to the grafted, ungrafted scion and ungrafted rootstock conditions. The bar charts (on the right) show the relative abundance of the predicted above taxa at the taxonomic class level. (A, B) Above taxa fraction of 101C and C101 at T1. (C, D) Above taxa fraction of FC and CF at T1. (E, F) Above taxa fraction of BW and WB. (G,H) Above taxa fraction of 101C and C101 at T2. (I, J) Above taxa fraction of FC and CF at T2. Genus information of the outer squares are detailed in the last table (K).



**Figure S6: Rarefaction curves**

Rarefaction curves generated for 16S rRNA gene sequences obtained from samples. Panels represent the rarefaction curves of aggregates of the grape vine samples from the first time points (a), the second time points (B), watermelon and bottle-gourd samples (C).



---

A la fin de ce chapitre 2, nous avons conforté l'idée, grâce à un plan d'expérience adapté, que LA VIGNE pourrait être considérée comme un HOLOBIONTE et avons donc renforcé la VALIDITÉ DU CONCEPT d'holobionte.

Il est frappant de constater que même si un effet plante, et en particulier un fort effet porte-greffe, impacte la structuration des microorganismes, on constate une hétérogénéité dans la composition des communautés entre individus. Ce dernier point interroge donc sur les autres facteurs qui gouvernent ces variations.

Dans l'hypothèse de validité du concept d'holobionte, la compréhension de cette hétérogénéité observée du microbiote est donc importante à développer.

Dans les chapitres suivants, nous avons cherché à analyser cette hétérogénéité par l'analyse de la DYNAMIQUE TEMPORELLE et des DÉTERMINANTS ENVIRONNEMENTAUX qui structurent les assemblages microbiens. Ces études doivent permettre de consolider les bases de connaissances en écologie microbienne pour son APPLICATION À LA DÉFINITION DU TERROIR MICROBIOLOGIQUE.

---



# **CHAPITRE 3 - VIGNE & ASSEMBLAGES MICROBIEN**

**Dynamique temporelle et déterminants environnementaux  
du microbiote endosphérique racinaire à l'échelle d'un  
domaine viticole**

## **CHAPITRE 3.1**

**FACTEURS  
ENVIRONNEMENTAUX &  
LIES A LA VIGNE**

## **CHAPITRE 3.2**

**DYNAMIQUE  
TEMPORELLE**





## **CHAPITRE 3.1 - FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX & LIÉS À LA VIGNE**

**Les facteurs qui déterminent la composition de l'endosphère du microbiote des racines de la vigne sont à la fois abiotiques et spécifiques à la plante.**





### **Résumé du Chapitre 3.1 -Effet des facteurs environnementaux et spécifiques de la vigne sur le microbiote**

Une recherche collaborative avec un vignoble a émergé suite à des questionnements sur l'assemblage et les rôles écologiques des microorganismes. Il est largement reconnu que les plantes sont colonisées par un microbiote complexe et très diversifié, qui contribue à plusieurs fonctions de la plante. De ce fait, ce microbiote participe également à la qualité et aux propriétés organoleptiques des vins dans le cas de la vigne. Le microbiote des plantes varie dans l'espace et dans le temps malgré un recrutement actif et déterminé à partir du réservoir du sol. Une des questions essentielles de l'écologie microbienne est donc de comprendre les facteurs qui façonnent ce microbiote.

Depuis une dizaine d'années, des études ont mis en évidence l'existence de patrons géographiques dans les assemblages microbiens de différents bio-compartiments de la vigne, liant ainsi, des caractéristiques propres de chaque région viticole et de chaque vin à des patrons spatiaux spécifiques de microorganismes. Une nouvelle définition du *terroir* de la vigne a donc été proposée : *le terroir microbiologique de la vigne*. La plupart des études qui ont analysé les microorganismes associés à la vigne ont été menées à grande échelle (par exemple, plus de 100 km), entre différents continents ou régions, et elles ont analysé principalement le microbiote du sol et de la rhizosphère.

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur le microbiote de l'endosphère racinaire, la fraction la plus intime des microorganismes associés aux plantes et avons analysé l'effet des variables abiotiques et des facteurs spécifiques aux plantes sur ce microbiote endophytique. Pour ce faire, nous avons travaillé à l'échelle d'un domaine viticole (petite échelle spatiale) où la roche-mère et les sols sont supposés être homogènes, et où les pratiques sont similaires d'une parcelle à l'autre. Nous avons émis l'hypothèse que la composition en microorganismes des racines est déterminée par des facteurs abiotiques (ratio C/N, contenu en matière organique (MO), pH et P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (g/kg)) et spécifiques aux plantes (c'est-à-dire le cultivar et l'âge des plantes).

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons analysé les variations de la composition bactérienne et fongique des plants de vigne (i) à l'échelle du vignoble (échelle  $\gamma$ -diversité) et (ii) au sein d'une même parcelle (échelle  $\alpha$ -diversité).

Nous avons échantillonné les racines de 8 pieds de vigne équidistants au sein de 37 parcelles (nombre équilibré de parcelles plantées avec les cépages Cabernet-Sauvignon et Merlot). Nous avons analysé, par séquençage massif, les fragments d'amplicon du gène de l'ARNr SSU (bactéries et champignons) dérivés de l'endosphère racinaire des 296 échantillons prélevés. Nous avons testé l'effet des facteurs environnementaux sur la structure du microbiote en combinant une analyse multivariée (analyse canonique des correspondances - CCA) et des modèles univariés (modèles linéaires (échelle  $\gamma$ ) et modèles mixtes linéaires (échelle  $\alpha$ )).


Dans cette étude, nous avons montré que le pH du sol provoque des changements de composition au

sein de la communauté bactérienne (tous phyla confondus) ainsi qu'un enrichissement de ce pool bactérien tandis que l'âge des plants de vigne et le cépage influencent seulement la composition en bactéries (l'identité). A l'échelle du phylum, le pH et de la MO du sol, ainsi que le cépage et l'âge causent des changements de communautés liés soit à un enrichissement (Protéobactéries), soit à un appauvrissement (Actinobactéries, Acidobactéries) des communautés bactériennes.

De plus, nous avons montré que la communauté fongique (tous phyla confondus) est plus riche dans le cépage Merlot et que la composition des champignons diffère entre les deux cépages, tandis que le rapport C/N et l'âge de la vigne affectent la composition de l'ensemble de la communauté fongique mais ne modifient pas la richesse fongique. A l'échelle du phylum, les facteurs abiotiques ou spécifiques aux plantes sont responsables des changements des communautés fongiques (les facteurs significatifs dépendent des phyla considérés) mais ne modifient pas la richesse en champignons.

Notre plan d'échantillonnage multi-échelles nous a permis de mettre en évidence une hétérogénéité spatiale marquée du microbiote de la vigne à l'échelle individuelle de la plante (échelle  $\alpha$ ) et à l'échelle d'un groupe d'individus au sein d'une parcelle (échelle  $\gamma$ ). Comme supposé, cette variabilité est expliquée par des changements dans les facteurs environnementaux comprenant les facteurs abiotiques et les facteurs spécifiques aux plantes. Ces facteurs environnementaux façonnent les communautés de bactéries et de champignons en modifiant l'identité des groupes taxonomiques et, dans une moindre mesure, en modifiant leur richesse et leur diversité. Nos résultats révèlent donc l'existence d'une nouvelle dimension plus fine (échelle spatiale plus petite) à la définition du *terroir microbiologique* puisque l'on observe une hétérogénéité spatiale des communautés microbiennes de l'endosphère racinaire au sein même d'une parcelle d'un seul vignoble sous l'influence des conditions environnementales locales.

# The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors


 Marine Biget<sup>1,4\*</sup>, Cendrine Mony<sup>1</sup>, Marc Aubry<sup>2</sup>, Olivier Jambon<sup>1</sup>, Achim Quaiser<sup>1</sup>, Véronique Chable<sup>3</sup>, Sabrina Pernet<sup>4</sup> and Philippe Vandenkoornhuys<sup>1</sup>


<sup>1</sup> Université de Rennes 1, CNRS, ECOBIO (Ecosystèmes, biodiversité, évolution) - UMR 6553, F-35000 Rennes, France

<sup>2</sup> Université de Rennes 1, CNRS, - UMS 3343 OSUR, F-35000 Rennes, France

<sup>3</sup> Laboratory INRAE UMR BAGAP INRA Centre Bretagne-Normandie, France

<sup>4</sup> Château Palmer, lieu-dit Issan, Margaux, France

 \*corresponding author: marine.biget@univ-rennes1.fr

 Associate editor: Isabelle Masneuf-Pomarède

## ABSTRACT

Microorganisms associated with plants are determinant for their fitness, but also in the case of vine grapes, for the quality and quantity of the wine. Plant microbiota is, however highly variable in space despite deterministic recruitment from the soil reservoir. Therefore, understanding the drivers that shape this microbiota is a key issue. Most studies that have analysed microorganisms associated with vines have been conducted at large scales (e.g., over 100 km) and have analysed the bulk soil and the rhizosphere. In this study, we focused on the root-microbiota endosphere, the most intimate fraction of microorganisms associated with plants. We sampled vine roots in 37 fields distributed throughout a vineyard to investigate drivers shaping the grapevine microbiota at the  $\alpha$ - (i.e., within-field) and  $\gamma$ - (i.e., between-field) diversity scales. We demonstrated that vine endospheric microbiota differed according to both the edaphic and plant-specific parameters including cultivar type and age. This work supports the idea of an existing *microbial terroir* occurring within a domain and offers a new perspective for winemakers to include the *microbial terroir* in their management practices.

## KEYWORDS

root microbiota, endosphere, vineyard, environmental factors, plant-specific factors, small scales

Supplementary data can be downloaded through: <https://oenone.eu/article/view/4616>

## INTRODUCTION

Microorganism-plant interactions are the basis of fertility ecosystem services (e.g., van der Heijden *et al.*, 2008). Indeed, microorganisms associated with their host plant (i.e., plant microbiota) affect not only plant mineral and hydric nutrition but also plant health, by improving plant resistance to drought and pathogenic attacks (e.g., Rolli *et al.*, 2015; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015; Compant *et al.*, 2019). Microbiota can then deeply affect the fitness of plants. In the case of grapevines, microorganism composition has been shown to not only influence plant growth and development but also the quality and the quantity of the resulting wine, for instance by shaping the volatile compound profiles in grapes (Knight *et al.*, 2015; Belda *et al.*, 2017). Microorganisms are recruited from the soil microbial reservoir by the plant to form the rhizosphere from which a fraction of the microorganisms can colonise the inner part of the plant (i.e., the endosphere) (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). This process has been suggested to be mainly determinist (Morrison-Whittle and Goddard, 2015). Microorganism distribution is still highly variable from one place to the other and understanding the drivers of microorganism variability is, therefore, a key issue for wine production. So far, drivers shaping microbial distribution in vineyards have been analysed using the biogeography framework (*sensu* MacArthur & Wilson, 1967). Analyses have thus focused on large geographical scales of more than 100 km, in continental and inter-regional studies. These studies have analysed different plant compartments (root, leaf, grape) and soil types (Bokulich *et al.*, 2014; Knight *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2018), and only a very small number examined vine microbiota at smaller geographic scales. For instance, Miura *et al.*, (2017) demonstrated differences in the grape and leaf microbiota among six Chilean vineyards located 35 km apart. Differences in fungal grape microbiota were shown to depend on the geographical distance between them following a distance-decay relationship, validating the biogeography hypothesis (Miura *et al.*, 2017). Knight *et al.*, (2020) investigated soil microbiota at a smaller scale, in four different vineyards situated within a 2-km radius. They observed geographic differences among fungal communities driven by local environmental heterogeneity, whereas they found no specific pattern when they analysed fermentative yeasts (Knight *et al.*, 2020). A recent study provided the first evidence of local

soil properties producing variations of fungal and bacterial communities within a single vineyard (Liang *et al.*, 2019). Despite the use of similar practices and of a very limited number of vine genotypes, soil microbial communities near the vine plants were strongly heterogeneous, and was only partly explained by soil characteristics (Liang *et al.*, 2019). Because endophytes are recruited in the soil microbiota, this local-scale patchiness of the soil microbiota likely shapes the microbial composition of the individual vines.

However, despite its tremendous importance, the root-endospheric microbiota has been widely overlooked to date in vineyards, and most agricultural crops. At the vineyard scale, non-random variations in the endophytic bacterial and fungal communities are likely explained by the heterogeneous patterns of soil components. Indeed, microbial recruitment to form the root-endospheric microbiota is mainly shaped by the soil reservoir, which can differ depending on changes in the physical-chemical properties of the soil (Plassart *et al.*, 2019). Soil organic carbon, pH, the C/N ratio and phosphorus contents are the main factors that have a significant influence on bacterial and fungal consortia in soil microbial reservoirs in vineyards described so far (Zarraonaindia *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2019), along with grape-surface microbiota (Bokulich *et al.*, 2014). In addition, because the recruitment of endophytic bacterial and fungal communities is plant-dependent, these assemblages are likely shaped by plant-specific factors such as grape type (cultivar type), growing seasons, the age of the vine and the rootstock genotype (Zarraonaindia *et al.*, 2015; Novello *et al.*, 2017; Marasco *et al.*, 2018; Berlanas *et al.*, 2019). In addition to the strong economic interest linked to vine plant culture, vine plants offer the ideal plant model to study the rules of microbiota assembly because vines are highly genetically homogeneous perennial plants. Differences in the cultivar microbiota can be assumed to be linked to a genotype effect and the preferential associations of microorganisms with a particular host genotype due to both passive barriers to colonization and active recruitment by the plants, especially through root exudates (Dennis *et al.*, 2010). Recruitment may also vary over time depending on microbial succession processes and plant requirements during their different developmental stages or to face and buffer different kinds of stress (Bulgarelli *et al.*, 2013; Vives-Peris *et al.*, 2020). First, microbial communities are hypothesised to depend on the composition of the first

species to colonise (priority effect) (Werner and Kiers, 2015) while preferential selection by the plants can actively occur later (host preference) (Vandenkoornhuysse *et al.*, 2002). Changes in the plant microbiota over time are expected to depend on the seasonal dynamics (Davison *et al.*, 2011) but also throughout plant development (i.e., interannual changes related to ageing). Roots are therefore organs of prime importance for the study of microorganisms associated with the vine as they form an ecological filter and act as a reservoir of specialised microorganisms for the other plant compartments (Vandenkoornhuysse *et al.*, 2015; Martínez-Diz *et al.*, 2019).

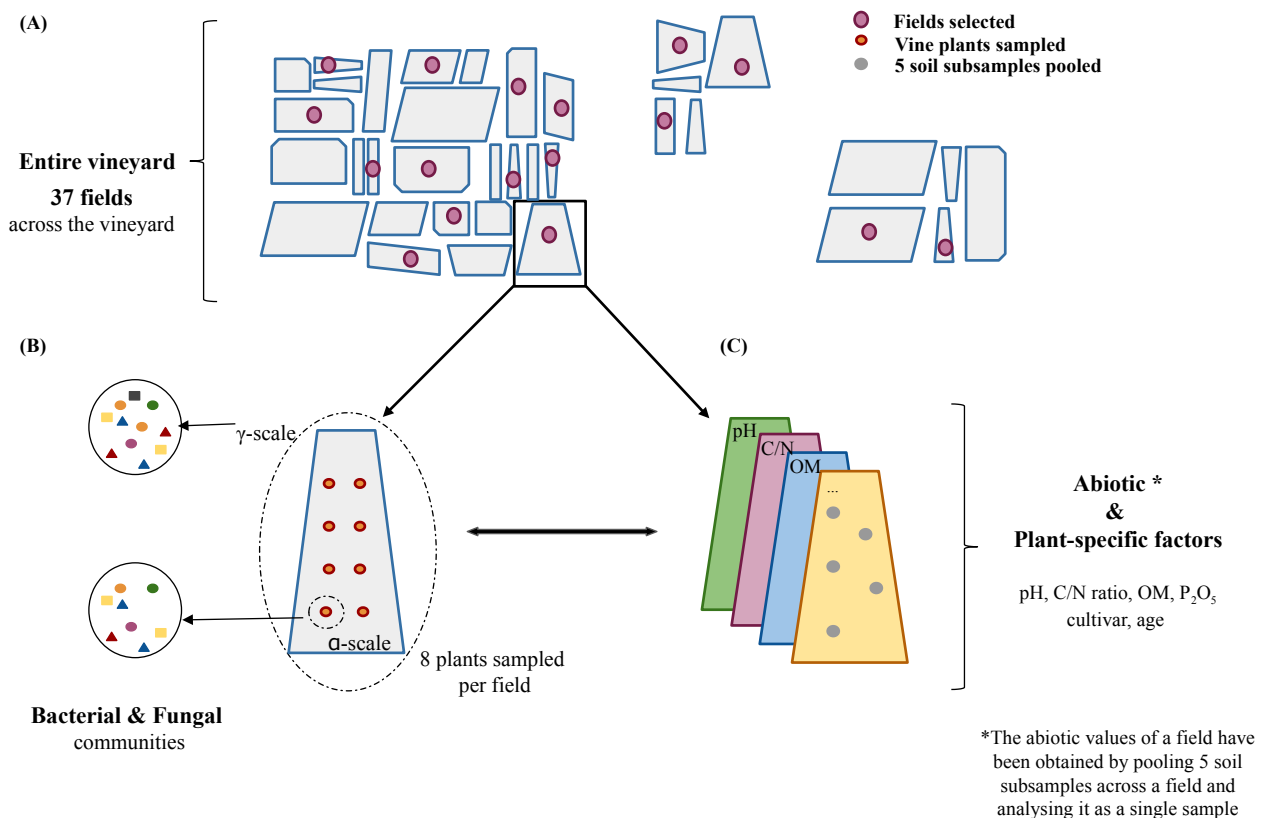
To advance our understanding of the factors driving microorganisms assembly, we analysed the effect of abiotic variables and plant-specific factors on the endophytic microbiota associated with vine roots. To this end, we worked in a vineyard domain located in Margaux (France) where the bedrock and soils are assumed to be

homogeneous, and practices are similar across fields. We hypothesised that the composition of both the bacterial- and fungal-root-endosphere is determined by abiotic and plant-specific factors (i.e., the cultivar and the age of the plants). To address these hypotheses, we analysed variations in the bacterial and fungal composition of vine plants (i) at the scale of the vineyard ( $\gamma$ -diversity scale) and (ii) within a single field ( $\alpha$ -diversity scale). We analysed root endosphere derived SSU rRNA gene amplicon fragments (bacteria and fungi) from 296 samples recovered from 37 fields within a single vineyard (Experimental design, Figure 1).

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Study site and field selection

We analysed the root microbiota in individual vine plants collected in a single 66-ha vineyard located in Margaux (*protected designation of origin*; “AOP” in French “*Appellation d’Origine Protégée*”)



**FIGURE 1.** Presentation of the experimental design.

(A) Scheme of the vineyard and distribution of the 37 sampled fields.

(B) Plan showing the location of the 8 plants sampled in each of the 37 fields. The  $\alpha$ -scale corresponds to the individual scale (one vine plant); the  $\gamma$ -scale represents the group of individuals at the field scale. The bacterial and fungal microbiota in each sample were identified using mass sequencing of amplified SSU rRNA gene fragments.

(C) Environmental factor data obtained from the vine-makers dataset to test their effect on the bacterial and fungal communities at both  $\alpha$ - and  $\gamma$ -scales. The abiotic values have been obtained by analysing a pool of 5 soil subsamples of a field.

in France (45°2'12.73 "N; 0°40'9.84 "O) in June 2018. The region is characterised by a temperate climate with an average temperature of 14.2 °C (min: 1.6 °C; max: 36.3 °C) and cumulative annual precipitation of 934mm. This vineyard has been managed with biodynamic practices for several years and is actively engaged in practising sustainable viticulture. We sampled 37 fields with a balanced number of fields with either Cabernet-Sauvignon or Merlot cultivars, and that included all the different ages of the vines in the vineyard. The range of the ages of vine plants were between 3 and 80 years old (Table S1) and the two studied cultivars included the same number of fields per range of ages. In each field, eight equidistant vine plants were selected to cover the field variability (mean field area 0.79 +/- 0.36 ha) all of the same age and genotype (Figure1).

## 2. Characteristics of the environmental variables

Each field was characterised by abiotic factors linked to soil conditions, biotic factors linked to the type of cultivar (Cabernet-Sauvignon and Merlot), and the age of the vine. In all 37 fields, abiotic factors were measured including the C/N ratio, organic matter content (OM), pH and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (g/kg) (Figure 1, Table S1). These edaphic parameters were selected because they are known to potentially impact the soil microorganisms and thus possibly the plant recruitable microorganism reservoir (e.g., Santoyo *et al.*, 2017). The analyses were conducted on 37 soils samples collected at a depth of 25 cm. These soil samples were composed of a mix of five soil sub-samples per field representing different areas of a field. All the measurements were performed by Auréa AgroSciences (Ardon, France) under the request of the wine-makers for other vineyard management purposes. We compared these measures through time (i.e., through years, with measures not performed at the same period of the year) and found very similar values (e.g., highest range of variation in pH within a given field of 0.2). It can be suggested homogeneity. Thus, we used these edaphic values per parcel as an environmental proxy for the 8 sampled plants within a parcel. Within a given field, we thus concluded the homogeneity of edaphic parameters. To satisfy the assumption of independence among variables, we checked that these variables were not correlated (i.e., Pearson's tests showed that none of the correlation estimates were above 0.7) (Dormann *et al.*, 2013).

## 3. Root sampling and DNA extraction

We sampled 296 vine roots in June 2018 at the vine flowering stage, a period of very active vegetative growth. Roots were collected with a spade near the stem, to obtain a homogeneous root stage at a depth of from 5 to 20 cm. The roots were removed manually using gloves, placed in individual hermetic bags and stored in cooled boxes. The roots were then thoroughly washed first with tap water and then with a 5 % Triton™ X100 solution for 10 minutes. They were rinsed several times using sterile ultra-pure water, placed in sterile micro-tubes and stored at -80 °C until DNA extraction. The total root DNA was extracted at the GENTYANE platform (Clermont-Ferrand, France) using magnetic bead technology (sbeadex™) on an oKtopure™ LGC Genomics automat. After the sample's mechanical grinding, nucleic acids were captured with the sbeadex™ magnetic particles. After washing steps to remove impurities the nucleic acid was eluted in the Beadex elution buffer. DNA concentration was measured using Hoechst 33258 reagent and a TECAN Infinite® 1000 instrument. DNA extracts were then stored at -20 °C until amplicon processing.

## 4. Molecular work

All the 296 extracted DNAs were normalised at 10 ng/μl using TE 0.1X to ensure the use of similar DNA concentrations for all the PCRs. The fungal community in vine roots was analysed by amplifying an 18S rRNA gene fragment with the specific fungal primers NS22b (5'-AATTAAGCAGACAAATCACT-3') and SSU817 (5'-TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA-3'). The bacterial community was analysed from PCR amplification of a 16S rRNA gene fragment (V5-V7 16S regions) using the bacterial primers 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3') and 1223R (5'-CCATTGTAGTACGTGTGTA-3'). These primers were chosen because they do not amplify plant DNA and allow, *in silico*, the best bacterial sequence recruitment from both Sylva and GreenGenes databases compared to the other commonly used primer sets (unpublished *in silico* benchmark analysis). Both specific primers were customised to include sample tags and Illumina® adaptors. To ensure a normalised PCR mix and avoid contamination, Illustra™PuReTaq Ready-to-go beads (GE Healthcare®) were used for all the amplifications. The two primer sets and the PCR conditions associated with the specific target are detailed in Vannier *et al.*, (2018). PCR products were cleaned with AMPureXP magnetic

beads (Agencourt®) using an Agilent Bravo Automated liquid handling platform (Agilent®) and quantified with a Quant-iT PicoGreen™ dsDNA Assay Kit to allow normalization at the same concentration. Library preparation and sequencing were performed at the Human and Environmental Genomics Platform (HEG platform, Rennes, France). Briefly, a second PCR using the Smartchip-Real-Time PCR machine (Takara) performed multiplex tagging (up to 384 amplicons in one-step PCR), the resulting tagged-amplicon pool was purified (AMPureXP, Agencourt®) and quantified using Kapa Library Quantification Kit-Illumina® on an LC480 LightCycler qPCR machine (Roche®). The library was sequenced on an Illumina MiSeq instrument (PE-2x250 cycles).

## 5. Sequence trimming and clustering

The base-calling step was performed on the MiSeq instrument with CASAVA v1.8 software (Illumina). Sequence data trimming consisted of removing primers and deleting reads containing unidentified bases using Cutadapt software. As we mixed fungal and bacterial amplicons, we processed the fastq files to separate the two types of reads based on their specific DNA sequence (homemade script–EcogenO platform) and then analysed them separately. These good-quality sequences were then processed with the FROGS pipeline (Escudié *et al.*, 2018) using the standard protocol for bacterial reads and after a particular pre-processing step for fungi (Kozich *et al.*, 2013). The FROGS pipeline notably includes SWARM as a clustering strategy, which enables analysis of reads without using the standard identity threshold of classical OTUs (97 %), and rather to produce what we call herein ‘sequence-clusters’. In comparison to the ASV method (Callahan *et al.*, 2017), this clustering strategy and the subsequent filtering (see below) have the advantage to limit the over-estimation of sample richness (Escudié *et al.*, 2018) induced for instance by a multicopies artefact. The following steps were performed as recommended by Escudié *et al.*, 2018. Briefly, these steps consisted of using a specific algorithm for de-noising and a chimera removal process followed by a stringent filter to avoid artificial sequence-clusters. To ensure high quality and stringent analysis, only sequences present in three different samples (i.e., at least in 1 % of the samples) were retained and included in the sequence-clusters. Reads were filtered using the quality of the affiliations with a threshold of at least 95 % coverage and 95 % identity (BLAST).

Finally, the taxonomic affiliations were determined using Silva132 16S rRNA for bacteria (Quast *et al.*, 2012) and Phymyco-DB databases for fungi (Mahé *et al.*, 2012).

The stringent parameters applied in the FROGS pipeline resulted in the production of data matrices containing 2,778,222 reads for bacteria and 1,549,109 reads for fungi. Rarefaction curves were generated using R (version 3.6.1) with the function ‘rarefy’ in the vegan 2.5-6 package. To perform subsequent statistical analysis, we normalised the number of reads for each bacterial and fungal dataset. Based on graphical observations (rarefaction curves), we normalised to the same number of reads for bacteria and fungi to 4264 and 1447 reads per sample respectively (Figure S1). Samples with fewer reads were removed from the dataset resulting in 34 fields for bacterial datasets and 36 fields for fungal datasets (i.e., a field being removed when more than 50 % of the samples did not satisfy the sequencing depth). The final matrices containing 1051 bacterial and 158 fungal sequence-clusters were finally used for the statistical analyses. We calculated sequence-cluster richness and the diversity index (Simpson’s evenness) using the R ‘vegan’ package (Table S2) at two spatial scales: the vineyard level ( $\gamma$ -diversity scale) and the within-field level ( $\alpha$ -diversity scale). Measures at the  $\gamma$ -scale were calculated using the total number of sequence-clusters and the mean number of reads. For all the statistical analyses, we decided to work at the phylum level because a large part of the sequence-clusters observed were unknown at the species level and a large proportion of them are unknown at higher taxonomic levels. We checked for the redundancy of diversity indices (Richness and Simpson indices) by making sure their correlation (Pearson’s test) was below 0.70 (Dormann *et al.*, 2013). None of the estimates were higher than 0.70, except the correlation estimate (0.75) between the sequence-cluster richness of  $\delta$ -Proteobacteria and the Simpson index of  $\gamma$ -Proteobacteria.

## 6. Statistical analyses

We analysed the effect of environmental factors on microbiota structure with a combination of multivariate analysis (Canonical correspondence analysis–CCA) and univariate models.

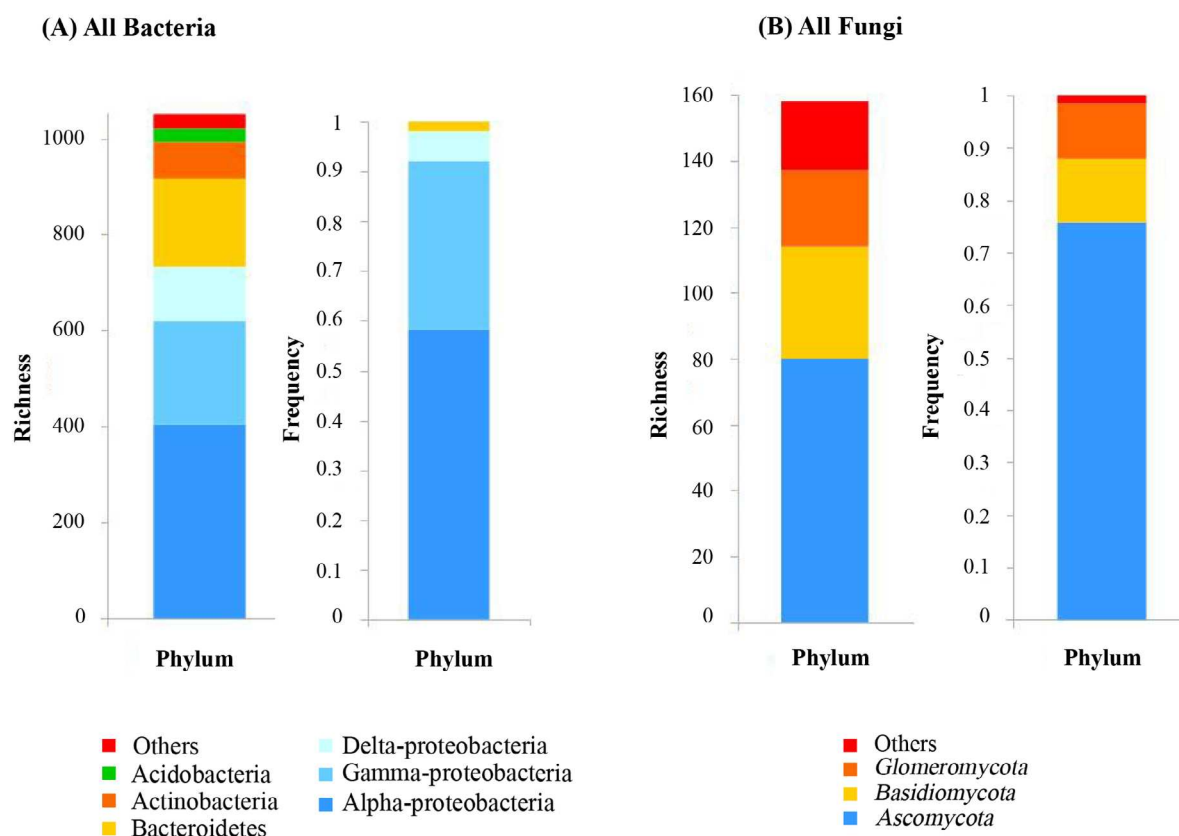
Canonical correspondence analysis (CCA) was used to explore whether the microbial sequence-cluster composition (i.e., bacterial and fungal microbiota composition) depended on plant-specific factors or abiotic variables.



Separate analyses were performed for “all bacteria/fungi” communities, i.e., the entire pools of both microbial communities, and the subsequent phyla separately. We coupled the matrix of the sequence-cluster composition under the constraint of the plant-specific/abiotic variables matrix (age, cultivar, pH, C/N ratio, organic matter (OM),  $P_2O_5$ ). Plant genotypes (i.e., rootstock genotype and scion genotype) sampled within a field were identical, but rootstock genotype varied among fields. However, the rootstock genotype was unknown for some of the parcels independently of the age of the parcel. Therefore, we did not include rootstock genotype in the analyses. Furthermore, we tested the rootstock effect on the partial data set and found no detectable effect on the microbiota (i.e.,  $p > 0.05$ ). Rootstock variations were thus considered herein as a background noise expected of the same range across age categories.

Bacterial and fungal sequence-cluster composition of the fields was assessed using the normalised number of reads for sequence-clusters. The significance of the independent variables in the CCA structure was tested using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) with 999 permutations. These analyses were performed using the ‘vegan’ package.

We used respectively linear ( $\gamma$ -diversity scale) and linear mixed models ( $\alpha$ -diversity scale) to analyse the effect of abiotic factors (pH, C/N ratio, OM and  $P_2O_5$ ) and plant-specific factors (age and cultivar) on sequence-cluster richness and evenness for both fungi and bacteria. For the  $\alpha$ -scale analysis, we considered ‘field’ as a random effect. All the models ( $\alpha$ - and  $\gamma$ -scale) were performed using a model-averaging method (Burnham and Anderson, 2002).



**FIGURE 2.** Description of the microbial communities at vineyard scale.

Sequence-cluster richness and relative abundance of the root endospheric bacterial (A) and fungal (B) microbiota of the vine plant at the phylum level.

(A) N= 34 fields. The «others» group contains phyla with limited number of sequence-clusters (10 or fewer sequence-clusters): Chlamydiae, Chloroflexi, Dependistia, Fibrobacteres, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Spirochaetes, Verrucomicrobia. Three representative sub-phyla of Proteobacteria, Alpha-proteobacteria, Gamma-proteobacteria and Delta-proteobacteria are represented to provide the required level of information.

(B) N=36 fields. The «others» group contains phyla with a limited number of sequence-clusters (less than 10 sequence-clusters): *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, Multi-affiliation.

The model-averaging method enables the calculation of better estimates (i.e., higher mathematical accuracy) as well as more reliable confidence intervals than standard methods like model selection (Fletcher, 2018). All possible models (combination of explanatory variables) were generated and ranked using the Akaike information criterion corrected for small sample sizes (AICc). We produced full-model averaged estimates of each independent variable across the most parsimonious models ( $\Delta\text{AICc} < 2$ ) and visually checked the normality of the residuals. We considered independent variables to be significant if their 95 % confidence intervals did not overlap with zero (Burnham and Anderson, 2002). Finally, we calculated the proportion of variance (adjusted  $R^2$  for the  $\gamma$ -scale and marginal  $R^2$ , conditional  $R^2$  for the  $\alpha$ -scale) of the most parsimonious model ( $\Delta\text{AICc} = 0$ ) as the values did not significantly differ from the values of the averaged models (Nakagawa and Schielzeth, 2013).

All statistical analyses were performed using R.3.6.2 (R Core Team). Linear mixed models, model averaging and associated  $R^2$  were calculated using the following packages: ‘lmerTest’, ‘lme4’, ‘nml’, ‘car’, ‘MuMIn’ and ‘AICcmodavg’.

## RESULTS

### 1. Composition of the vine root endospheric microbiota

Sequencing depths of both fungal and bacterial microbiota colonizing vine roots were sufficient to limit sequence-cluster subsampling (Figure S1). At the vineyard scale (i.e., the total microbial pool), the bacterial community in the root endosphere was dominated by the Proteobacteria phylum (733 sequence-clusters representing 72 % of the sequences in terms of relative abundance) (Figure 2). Within Proteobacteria,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Proteobacteria classes accounted for 404 (43 % of the sequences), 215 (25 % of the sequences) and 114 (4 % of the sequences) sequence-clusters respectively. The Bacteroidetes phylum represented 184 (12 % of the sequences) of the sequence-clusters. The vine-root microbiota contained 158 fungal sequence-clusters mainly composed of *Ascomycota* (80 sequence-clusters, 76 % of the sequences in term of relative abundance), *Basidiomycota* (34 sequence-clusters, 12 % of the sequences), and *Glomeromycota* (23 sequence-clusters, 10 % of the sequences) (Figure 2).

### 2. Drivers of the bacterial community in vine roots at both $\alpha$ - and $\gamma$ -diversity scales

We used canonical correspondence analysis (CCAs) to test for potential shifts in bacterial community compositions depending on the factors tested. At the  $\alpha$ -scale, we recorded significant effects of vine age, cultivar, and pH on the bacterial microbiota composition for the “all bacteria” community and all subsequent phyla (Figures 3A and S2A). The impact of OM, C/N ratio, and  $\text{P}_2\text{O}_5$  on bacterial composition depended on the phylum considered (Figures 3A and S2A). The composition of  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria, Actinobacteria and Acidobacteria communities was significantly influenced by all the factors tested (i.e., vine age, cultivar, pH, C/N, OM and  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) (Figures 3A and S2A). The composition of Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria and Bacteroidetes was significantly affected by the OM, the C/N ratio and the  $\text{P}_2\text{O}_5$  concentration respectively as well as the other factors shared by all the phylum (vine age, cultivar and the pH) (Figure 3A). At the  $\gamma$ -diversity scale, we found no significant relationship between the tested factors and bacterial composition, except for Actinobacteria that depended on the age of the vine (Figure S2B).

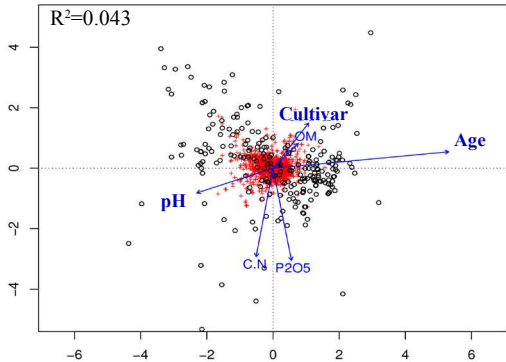
We used linear mixed models and calculated the full-model averaged estimates of each independent variable to test whether abiotic and plant-specific factors impacted bacterial richness and evenness. Unexpectedly, the effects of abiotic and plant-specific factors on bacterial-microbiota colonizing vine-roots varied depending on the taxa. The sequence-cluster richness of the bacteria microbiota (“all bacteria”) and Proteobacteria were positively related with soil pH and OM at the  $\alpha$ -diversity scale (Table 1A; Figure S3A). The sequence-cluster richness of the  $\gamma$ -proteobacteria increased with higher soil OM content (Table 1A; Figure S3A). Conversely, the sequence-cluster richness of the Actinobacteria and Acidobacteria were only impacted by plant-specific factors (Table 1A; Figure S3A). Indeed, the sequence-cluster richness of the Actinobacteria was higher in the Cabernet-Sauvignon cultivar than in Merlot and the sequence-cluster richness of the Acidobacteria increased with the age of the vine plants (Table 1A; Figure S3A). Interestingly, at the  $\gamma$ -scale, the sequence-cluster richness of almost all the bacterial taxa found to be significant (“all bacteria”, Proteobacteria,  $\alpha$ -Proteobacteria and Acidobacteria) was positively related with soil  $\text{P}_2\text{O}_5$  content and independent of all other factors (Table 1C).

**(A) Bacteria** CCA (sequence-clusterTable~pH+C/N+OM+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+Age+Cultivar)

**(i) All bacteria**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.28 1.72 **0.001\*\*\***



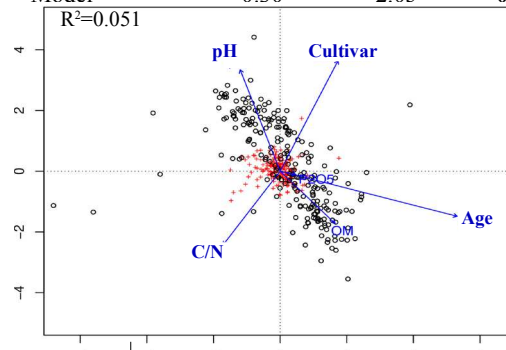
Factors	pH	Age	Cultivar
---------	----	-----	----------

F-value (p) 1.35\* 3.06\*\*\* 1.64\*\*\*

**(iv) Gamma-proteobacteria**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.30 2.05 **0.001\*\*\***



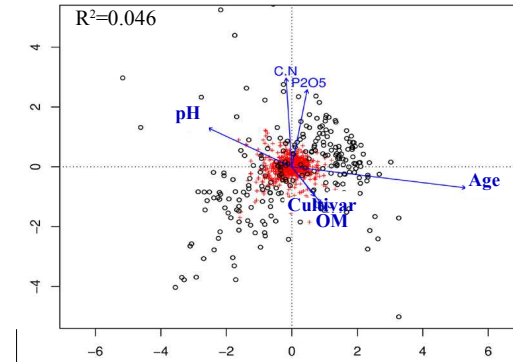
Factors	pH	C/N	Age	Cultivar
---------	----	-----	-----	----------

F-value (p) 1.84\*\* 1.95\* 3.89\*\*\* 2.00\*\*

**(ii) Proteobacteria**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.26 1.85 **0.001\*\*\***



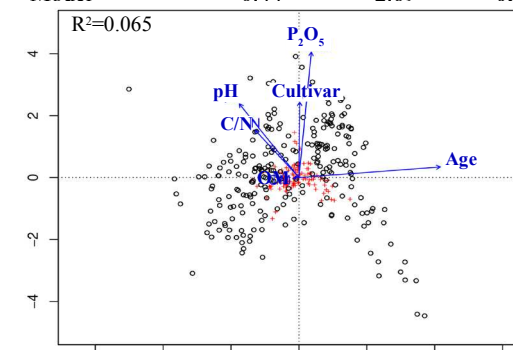
Factors	pH	Age	Cultivar
---------	----	-----	----------

F-value (p) 1.52\* 1.52\* 3.23\*\*\* 1.68\*\*\*

**(v) Delta-proteobacteria**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.44 2.69 **0.001\*\*\***



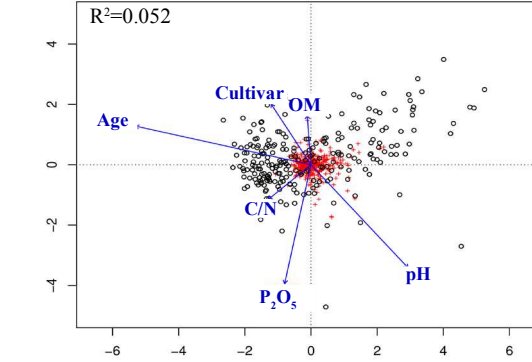
Factors	pH	C/N	OM	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Age	Cultivar
---------	----	-----	----	-------------------------------	-----	----------

F-value (p) 1.86\*\* 1.91\* 3.08\*\*\* 2.44\*\* 5.03\*\*\* 1.80\*\*

**(iii) Alpha-proteobacteria**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.20 2.12 **0.001\*\*\***



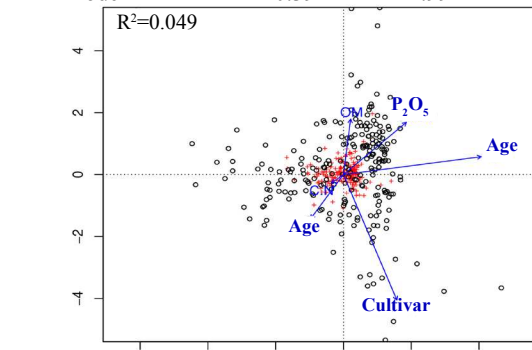
Factors	pH	C/N	OM	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Age	Cultivar
---------	----	-----	----	-------------------------------	-----	----------

F-value (p) 1.66\* 2.09\* 1.93\* 1.69\* 3.42\*\*\* 1.94\*\*\*

**(vi) Bacteroidetes**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.39 1.99 **0.001\*\*\***

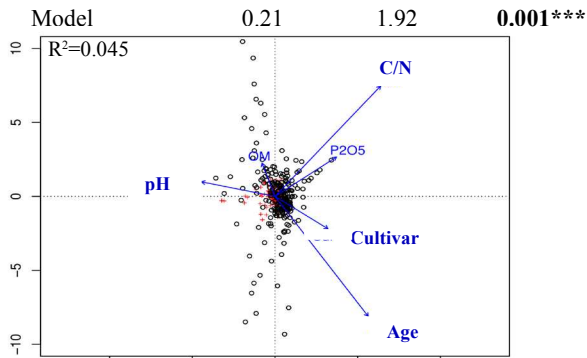


Factors	pH	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Age	Cultivar
---------	----	-------------------------------	-----	----------

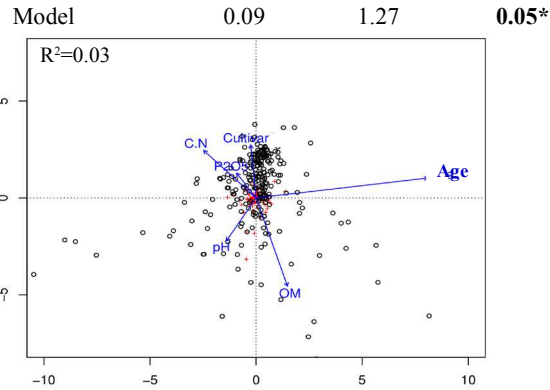
F-value (p) 1.35\* 2.04\* 3.67\*\*\* 2.15\*\*\*

**(B) Fungi** CCA (sequence-clusterTable~pH+C/N+OM+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+Age+Cultivar)

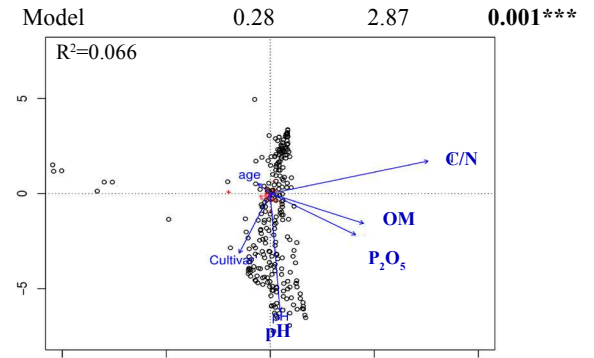
<b>(i) All fungi</b>				<b>(ii) Ascomycota</b>				<b>(iii) Basidiomycota</b>			
ANOVA	Chisq	F	p-value	ANOVA	Chisq	F	p-value	ANOVA	Chisq	F	p-value



Factors	pH	C/N	Age	Cultivar
F-value (p)	1.50*	3.12***	2.75***	1.47*



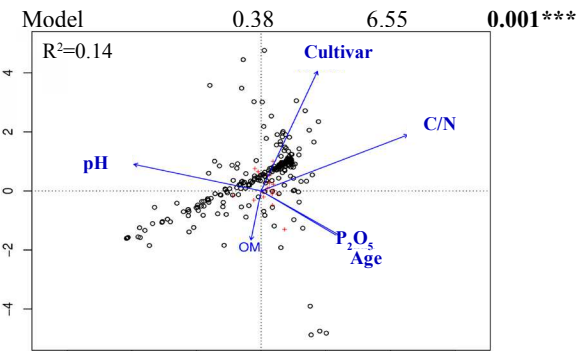
Factors	Age
F-value (p)	2.86***



Factors	pH	C/N	OM	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
F-value (p)	2.25*	6.01**	4.44***	2.16*

**(iv) Glomeromycota**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------



Factors	pH	C/N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Age	Cultivar
F-value (p)	5.0***	13.65***	4.46**	7.40***	7.71***

**FIGURE 3.** Effect of abiotic and plant-specific factors on the composition of the endospheric (A) bacterial and (B) fungal communities inhabiting the vine plant roots at the  $\alpha$ -scale.

Percentages of explained deviance and significance were calculated using ANOVA-like permutation tests with canonical correspondence analysis (CCA). Only major bacterial phyla are represented (A) on the figure. All fungal phyla are represented (B). ANOVA tables show the significance for the CCA model.

Factors tested: age of the vine plant, cultivar (Merlot or Cabernet-Sauvignon), OM (Organic Matter), C/N ration (carbon/nitrogen ratio), pH and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Factors which significantly influence the microbial composition are reported on tables.

Values are given (F-value) for the «all bacteria» / «all fungi» communities and the associated phyla when the explained deviance is significant (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ). Black dots represent the samples and red crosses represent sequence-clusters.

**TABLE 1.** Summary of the models calculated by model averaging that explain bacterial and fungal sequence-cluster richness and evenness at two scales of diversity analysis.

Alpha scale		pH			C/N ratio			OM		
(A) Richness	Inter	E	Z	CI	E	Z	CI	E	Z	CI
All Bacteria	194.95	15.56	<b>2.34*</b>	<b>2.5/28.6</b>				17.87	<b>3.36 ***</b>	<b>7.4/28.2</b>
Proteobacteria	134.86	12.32	<b>2.2*</b>	<b>1.3/23.3</b>				14.17	<b>3.12 **</b>	<b>5.4/22.9</b>
Gamma-proteobacteria	47.01							4.92	<b>3.52 ***</b>	<b>2.2/7.7</b>
Actinobacteria	17.03									
Acidobacteria	4.89									
All Fungi	37.00									
<i>Ascomycota</i>	18.90									
<hr/>										
(B) Evenness										
Actinobacteria	0.75									
<hr/>										
Gamma scale		pH			C/N ratio			OM		
(C) Richness	Inter	E	Z	CI	E	Z	CI	E	Z	CI
All Bacteria	657.46									
Proteobacteria	465.37									
Alpha-proteobacteria	271.42									
Acidobacteria	13.44									
<i>Ascomycota</i>	47.05									
<i>Glomeromycota</i>	13.18									
<hr/>										
(D) Evenness										
Alpha-proteobacteria	0.97				-0.0026	<b>2.3*</b>	<b>-0.005/-0.0005</b>	0.007	<b>2.07*</b>	<b>0.0004/0.014</b>
Actinobacteria	0.83									
Acidobacteria	0.74									

Models are based on variables of abiotic factors (pH, C/N ratio, OM and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and plant-specific factors (age and cultivar)

(A) Richness of the bacteria and fungi at the  $\alpha$ -scale - (B) Evenness of the bacteria and fungi at the  $\alpha$ -scale

(C) Richness of the bacteria and fungi at the  $\gamma$ -scale - (D) Evenness of the bacteria and fungi at the  $\gamma$ -scale

The table summarizes the model-averaged estimates (E), value «z-score» (Z) when significant \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; and 95 % confidence interval (CI) of the independent variable(s) according to the AICc framework. Confidence intervals that did not encompass zero are in bold.

R<sup>2</sup>m and R<sup>2</sup>c describe the  $\alpha$ -scale and adjusted-R<sup>2</sup> the  $\gamma$ -scale and were calculated for the best model.

(Table 1 continues on next page).

(Table 1 continued from previous page).

Alpha scale	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			Age			Cultivar			Model
(A) Richness	E	Z	CI	E	Z	CI	E	Z	CI	<b>R<sup>2</sup>m (R<sup>2</sup>c)</b>
All Bacteria										0.082 (0.13)
Proteobacteria										0.088 (0.17)
Gamma-proteobacteria										0.085 (0.15)
Actinobacteria							-3.07	<b>2.48*</b>	<b>-5.5/-0.6</b>	0.13 (0.24)
Acidobacteria				0.057	<b>3.11 **</b>	<b>0.02/0.09</b>				0.10 (0.33)
All Fungi							4.52	<b>3.14 **</b>	<b>1.7/7.3</b>	0.057 (0.15)
<i>Ascomycota</i>							3.59	<b>4.47 ***</b>	<b>2.0/5.2</b>	0.13 (0.19)
(B) Evenness										
Actinobacteria				-0.003	<b>3.69 ***</b>	<b>-0.005/-0.001</b>				0.17 (0.34)
Gamma scale	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			Age			Cultivar			Model
(C) Richness	E	Z	CI	E	Z	CI	E	Z	CI	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>
All Bacteria	304.13	<b>2.31*</b>	<b>46.4/561.8</b>							0.136
Proteobacteria	224.56	<b>2.42*</b>	<b>42.4/406.7</b>							0.157
Alpha-proteobacteria	124.04	<b>2.30*</b>	<b>18.2/229.9</b>							0.134
Acidobacteria				0.09	<b>2.04*</b>	<b>0.003/0.18</b>				0.102
<i>Ascomycota</i>							4.72	<b>2.21*</b>	<b>0.54/8.89</b>	0.107
<i>Glomeromycota</i>				-0.061	<b>2.32*</b>	<b>-0.11/-0.009</b>				0.118
(D) Evenness										
Alpha-proteobacteria										0.153
Actinobacteria				-0.003	<b>2.46*</b>	<b>-0.0045/-0.0005</b>				0.219
Acidobacteria				0.0021	<b>2.35*</b>	<b>0.0004/0.004</b>				0.142

Considering evenness at both  $\alpha$ - and  $\gamma$ -scales, we only observed few significant effects of environmental factors on the bacterial communities and age was the only plant-specific factor altering the evenness of the bacterial communities (Table 1B, Table 1D). Indeed,  $\alpha$ -Proteobacteria communities were more equitable with a high soil OM content but were less diverse with a higher C/N ratio at the  $\gamma$ -scale (Table 1D). Actinobacteria communities were more equitable in old vine plants but were dominated by certain sequence-clusters in young individuals at both  $\alpha$ - and  $\gamma$ -scales (Table 1B, Table 1D; Figure S3A). Acidobacteria displayed higher equitability with increasing ages of the vine plants at both the  $\gamma$ -scales (Table 1D).

To summarise the bacterial results, we found that soil pH caused shifts within the “all bacteria” community as well as enrichment of the microbial pool whereas the age of the vine plants and the cultivar influenced the composition but not the richness of the “all bacteria” community (Figure 3A and Table 1A). At the phylum level, significant effects of the soil pH and the soil OM, as well as the cultivar and the age of vine plants resulted in shifts of communities linked with either enrichment (Proteobacteria) or impoverishment (Actinobacteria, Acidobacteria) of the bacterial communities (Figures 3A; 2SA and Table 1A). Considering the other phyla, the impacts of the tested factors on microbial community structure caused shifts within the communities but no change in the bacterial richness (Figure 3A and Table 1A).

### 3. Drivers of the fungal community in vine roots at both $\alpha$ - and $\gamma$ -diversity scales

At the  $\alpha$ -diversity scale, we found significant effects of the pH, C/N ratio, vine age, and cultivar on the “all fungi” community composition (Figure 3B). *Basidiomycota* composition was also influenced by the concentration of OM and  $P_2O_5$  in the soil (Figure 3B). Changes in the composition of the *Glomeromycota* community were caused by the following factors: pH, C/N ratio,  $P_2O_5$ , age of the vine and cultivar (Figure 3B). At the  $\gamma$ -diversity scale, both the C/N ratio and the age of the vine significantly explained the fungal composition in the roots of the “all fungi” community (Figure S2B). We also demonstrated important effects of the pH, the C/N ratio, the age of the vine and the cultivar on the *Glomeromycota* community composition in vine roots (38.46 % significantly explained deviance; Figure S2B).

The effects of abiotic and plant-specific factors on fungal richness and evenness varied depending on the phylum considered. At the  $\alpha$ -diversity scale, the sequence-cluster richness of the fungal microbiota (“all fungi”) community was related to the cultivar alone and was higher in the Merlot cultivar (Table 1A; Figure S3B). This was mostly due to changes in the *Ascomycota* community, which was the only fungal phylum influenced by the factors we tested (Table 1A; Figure S3B). At the  $\gamma$ -scale, the sequence-cluster richness of the *Ascomycota* also responded to the cultivar and was higher in Merlot than in Cabernet-Sauvignon (Table 1C; Figure S3B). Interestingly, at the  $\gamma$ -scale, the *Glomeromycota* richness decreased with the age of the vine plants (Table 1C). Considering fungal evenness at both scales, no significant effects of either soil or plant-specific factors were found.

To summarise the fungal results, we found that the fungal community was richer in Merlot and the composition of fungi differed in Merlot and Cabernet-Sauvignon, whereas the C/N ratio and the vine age affected the composition of the entire fungal community (“all fungi”) but did not change sequence-cluster richness (Figure 3B; S2B and Table 1A). At the phylum level, either the abiotic or the plant-specific factors were involved in changes in the fungal communities but did not alter their richness (Figure 3B; S2B and Table 1A).

## DISCUSSION

### 1. Endospheric root microbial communities

In this study, we analysed the vine root-endosphere composition by characterizing both bacterial and fungal communities. The root endosphere mostly originates from the soil reservoir after passive or active recruitment (Bulgarelli *et al.*, 2012; Vandenkoornhuise *et al.*, 2015) and because of the significant impact of the root endosphere on plant health and growth, the endospheric microbiota may be key to better define the *microbial terroir* of vineyards.

This analysis of the vine root endosphere microbiota was performed at the level of a single domain at Margaux (France) to ensure homogeneous viticulture across the sampled plots. Elsewhere the gravelly sandy soils are known to be similar among parcels with no elevation and limited physico-chemical variations. From the sampled roots, a total of 1051 bacterial and 158 fungal sequence-clusters composed the vine-root endospheric microbiota in this study. The composition of the root endospheric microbiota in

the vine plants (i.e., Proteobacteria and *Ascomycota* as the major phyla) was comparable in size to other studies analysing roots endospheres of different types of plants as maize (Gomes *et al.*, 2018), agave (Coleman-Derr *et al.*, 2016), herbaceous plants (*Glechoma hederacea*) (Vannier *et al.*, 2018) and vine plants (e.g., for review Liu *et al.*, 2019). In vine plants, a recent study compared the bacterial and fungal microbiota of different bio-compartments and similarly as herein, demonstrated that the composition of the roots microbiota was dominated by the same two main phyla, Proteobacteria and *Ascomycota* (Deyett and Rolshausen, 2020; Liu and Howell, 2020). This observation of selective filtering leading to a high proportion of Proteobacteria and *Ascomycota* in the plant microbiota endosphere has been recently explained by both plant-microbiome co-evolution and niche adaptation (Trivedi *et al.*, 2020).

## 2. Multi-scale spatial heterogeneity of plant microbiota

Our multi-scale sampling design enabled us to demonstrate marked spatial heterogeneity in plant microbiota at the plant individual scale ( $\alpha$ -scale) and the scale of a group of individuals in the field ( $\gamma$ -scale). As hypothesised, this variability was explained by changes in environmental factors including abiotic factors, but also in plant-specific factors.

Because the global  $\gamma$ -diversity scale corresponds to the sum of  $\alpha$ -diversity +  $\beta$ -diversity (i.e.,  $\beta$ -diversity measuring the difference between individuals), low  $\beta$ -diversity (i.e.,  $\gamma$ -diversity  $\sim$   $\alpha$ -diversity) could lead to similar responses to environmental factors at both  $\alpha$ - and  $\gamma$ - scales, while strong  $\beta$ -diversity could lead to divergent responses between the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -diversity scales. It should be noted that differences in the detected statistical signal could also result from differences in the statistical power of the analysis between the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -diversity scales, i.e., sampling units are 8-fold higher at the  $\alpha$ -scale than at the  $\gamma$ -scale. Most of the relationships we detected differed at both diversity scales, for instance, the effects of the pH and OM on “all bacteria” community richness and the cultivar on the “all fungi” community richness were significant at  $\alpha$ -scale but not at  $\gamma$ -scale. Reciprocally, a few relationships were detected at the  $\gamma$ -scale but not at the  $\alpha$ -scale, for example, an increase in bacterial richness with an increase in soil  $P_2O_5$ .  $P_2O_5$  concentration may thus be heterogeneous particularly at a very fine scale and hence affect local microbial richness. Furthermore, we cannot exclude the existence of spatial variation

and possible patchiness in the  $P_2O_5$  bioavailability. Another example of such a relationship detected at the  $\gamma$ -scale but not at the  $\alpha$ -scale was a reduction in *Glomeromycota* richness in older individual vines compared to that in younger ones. This may be due to higher convergence in species composition among mature individuals in a given field (i.e., lower beta-diversity), leading to lower total species richness at the field scale. This convergence among individuals might be the result of a stronger influence of a host-preference effect in more mature individuals than in younger ones. Bulgarelli *et al.*, (2013) defined the root microbiota as a succession of dynamic processes combining primary colonization of microbes from the soil/rhizosphere to the roots and subsequent host recruitment of proper microorganisms depending on host requirements (Bulgarelli *et al.*, 2013). Our results suggest that both mechanisms – priority effect and host-preference – are likely to be inversely related and to depend on the stage of succession of the microbial assemblage in relation to the development of the host plant.

## 3. Bacterial- and fungal-root endosphere composition shaped by environmental factors

Confirming our hypotheses, environmental factors were seen to shape bacterial and fungi communities through changes in the sequence-cluster identity and to a lesser extent, by modifying their richness and/or relative evenness.

A pattern shared by the two taxonomic groups was the strong effect of pH. pH is widely recognised as an important driver of microbial communities, notably because it can act on microbial enzyme activity or can regulate the ionization balance in the soil, thereby affecting the accessibility of nutrients for microorganisms (Burns *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2019; Pacifico *et al.*, 2019). Most relationships between  $P_2O_5$ , C/N and OM and root endosphere microbial communities differed between bacteria and fungi but also within each group, suggesting fine adjustments of microbiota composition depending on these factors. For instance, the “all fungi” community was particularly affected by the C/N ratio whereas the “all bacteria” community appeared unaffected by this factor. As the C/N ratio is usually considered as a key proxy for nutrient accessibility (Zhang and Elser, 2017), changes in soil C/N ratio likely impact fungal biosynthesis processes as well as food-seeking strategies (Cleveland and Liptzin, 2007). At a finer scale of taxonomy, we showed a stronger effect of the C/N ratio on the *Glomeromycota* compared to the effect on the *Basidiomycota* community.



All the members of *Glomeromycota* are involved in arbuscular mycorrhization and are thus very important microorganisms known to supply their host plants with mineral nutrients and water and to improve host-plant resistance to different kinds of stress (e.g., Smith and Read, 2009), as already demonstrated in vine plants (Nicolás *et al.*, 2015; Trouvelot *et al.*, 2015). In exchange for these services, *Glomeromycota* receive carbon synthesised by their host (e.g., Smith and Read, 2009; Johnson, 2010). If the C/N ratio decreases (the N content is higher) in some cases, the vine plants would have easier and more direct access to nitrogen and this would directly impact the *Glomeromycota* community. Therefore, as suggested by our results, the *Glomeromycota* community is more likely to be affected by changes in the C/N ratio than other components of the fungal microbiota communities.

#### 4. Vine plants shaped their own bacterial and fungal root endosphere microbiota

We also demonstrated a general influence of cultivar and age on microbial composition but not necessarily an effect on richness. This suggests that these parameters induce a shift in sequence-cluster composition rather than affecting the number of species recruited. This shift may result from ecological and biological mechanisms. Like *Glomeromycota*, which show no host-plant specificity, it can be assumed that most members of the vine microbiota are not specific to their host. They are associated with a given host due to host-plant filtration of colonisers.

In agreement with this interpretation, different authors have reported filtering effects of the roots (e.g., Bulgarelli *et al.*, 2012) depending on the type of plant and/or plant genotype (Zarraonaindia *et al.*, 2015; Marasco *et al.*, 2018; Martínez-Diz *et al.*, 2019) involved in the recruitment of microorganisms. The analysis of grape and soil samples from three different cultivars showed that some bacterial sequence-clusters were specific to a particular cultivar (Mezzasalma *et al.*, 2018). Berlanas *et al.*, (2019) analysed microbiota in mature and young vineyards by focusing on the rhizosphere compartment and reported that, instead of a clear distinction between microbial communities in young and mature vineyards, differences were rather due to many different factors that included rootstock genotype. To our knowledge, our results also emphasised for the first time, a strong age effect of the vine on its root endosphere microbiota. This may be linked to a succession of

processes involved in the colonization of roots by microorganisms over the vine's lifetime (Chang and Turner, 2019). However, we cannot exclude an indirect effect of the history of management of the individual vine plants on these natural processes. Rootstock genotype plays a role in shaping and recruiting the endophytic microbial communities of the vine plants (D'Amico *et al.*, 2018; Marasco *et al.*, 2018). However, this age-related effect on the root endospheric microbiota could not be statistically linked to a rootstock genotype effect (see methods) and a plant-maturity related niche differentiation is more likely.

#### 5. Toward a microbial terroir at the vineyard scale

The idea of an existing *microbial terroir* in vineyards is gradually growing (Gilbert *et al.*, 2014; van Leeuwen *et al.*, 2018). Our results reveal new dimensions of the spatial profile of microbial communities in vineyards at the level of field in a highly homogeneous winegrower's domain in terms of soil bedrock and soil type (smaller geographic scale). This work is pivotal in that it demonstrates in vine plants that the endospheric microbiota differs according to both the environment and plant-specific parameters including cultivar and the age of the vine. If these new small-scale dimensions are confirmed by subsequent analyses (i.e., seasonal variability) and if these observed microbial variations are consistent with impacts on grapevine phenotypes, our work could offer wine-makers the opportunity to include this dimension in their production with the use of spatial maps of this *microbial terroir*. Because variations in microbial communities exist at the level of a single vineyard and in nearby locations, it is reasonable to suggest that understanding the complex interactions between bacteria, fungi and the vine plants could help vine-growers adapt their management practices and finally intensify the specificity of a vine and enhance the final product.

**Acknowledgements:** This work was supported by the “*Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie*” (ANRT) through an industrial CIFRE agreement between Château Palmer, Château Latour, Sovivins, Pépinière de Salettes and the University of Rennes 1 (Agreement N° 2017/1579). We are grateful to the GENTYANE (<http://gentyane.clermont.inra.fr/>) and, within ANAEE-France research infrastructure, the EcogenO platform ([https://ecogeno.univ-rennes1.fr/?\[en\]](https://ecogeno.univ-rennes1.fr/?[en])) for help with DNA extraction and amplicon sequencing, respectively.

We are also grateful to the Genotoul platform Toulouse Midi-Pyrénées (<https://www.genotoul.fr/>) for access to their bioinformatics pipeline and storage facilities. We would like to acknowledge all the trainees and people at Château Palmer for their help during the sampling campaign, especially Sylvain Fries who helped design the experiment and select the vine plants. We are also grateful to Sophie Michon-Coudouel, Romain Causse-Verdines and July Hémon for molecular analysis and to Léa Uroy and Lucie Lecoq for helpful advice on statistics.

**Data Accessibility:** cological data are available on Figshare on 10.6084/m9.figshare.12453602. Sequence data are available at European Nucleotide Archive (ENA) under accession number PRJEB39327.

**Authors contribution / Conflict of Interest:** MB, CM, SP, VC and PV conceived the project and PV, CM and MB set up the methodology of the study. MB, CM, OJ, AQ, and PV conducted the sampling. MB conducted lab experiments and sequence analysis with the help of PV. MA performed specific data analyses (homemade script - EcogenO platform). MB and CM performed the statistical analyses and MB wrote the first draft of the paper. All the authors gave their final approval for publication.

## REFERENCES

- Belda, I., Zorraonandia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 821. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821>
- Berlanas, C., Berbegal, M., Elena, G., Laidani, M., Cibriain, J. F., Sagües, A., & Gramaje, D. (2019). The Fungal and Bacterial Rhizosphere Microbiome Associated With Grapevine Rootstock Genotypes in Mature and Young Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1142. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01142>
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). PNAS Plus: From the Cover: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(1), E139-E148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110>
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppli, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., ... Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, *488*(7409), 91-95. <https://doi.org/10.1038/nature11336>
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 807-838. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Burnham, K.P., & Anderson, D.R (2002). *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. Springer-Verlag.
- Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, *91*, 232-247. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.002>
- Chang, C. C., & Turner, B. L. (2019). Ecological succession in a changing world. *Journal of Ecology*, *107*(2), 503-509. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13132>
- Cleveland, C. C., & Liptzin, D. (2007). C:N:P stoichiometry in soil : Is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? *Biogeochemistry*, *85*(3), 235-252. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9132-0>
- Coleman-Derr, D., Desgarnes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., ... Tringe, S. G. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native Agave species. *New Phytologist*, *209*(2), 798-811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, *19*, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- D’Amico, F., Candela, M., Turroni, S., Biagi, E., Brigidi, P., Bega, A., ... Rampelli, S. (2018). The Rootstock Regulates Microbiome Diversity in Root and Rhizosphere Compartments of *Vitis vinifera* Cultivar Lambrusco. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2240. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02240>
- Davison, J., Öpik, M., Daniell, T. J., Moora, M., & Zobel, M. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages: Selectivity in AMF-plant associations. *FEMS Microbiology Ecology*, *78*(1), 103-115. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01103.x>
- Dennis, P. G., Miller, A. J., & Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?: Root exudates and rhizosphere bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, *72*(3), 313-327. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x>
- Deyett, E., & Rolshausen, P. E. (2020). Endophytic microbial assemblage in grapevine. *FEMS Microbiology Ecology*, *96*(5), fiae053. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae053>

- Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., ... Lautenbach, S. (2013). Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*, *36*(1), 27-46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., ... Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, *34*(8), 1287-1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Fletcher, D. (2018). *Model Averaging*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58541-2>
- Gilbert, J. A., van der Lelie, D., & Zarraonaindia, I. (2014). Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(1), 5-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110>
- Gomes, E. A., Lana, U. G. P., Quensen, J. F., de Sousa, S. M., Oliveira, C. A., Guo, J., ... Tiedje, J. M. (2018). Root-Associated Microbiome of Maize Genotypes with Contrasting Phosphorus Use Efficiency. *Phytobiomes Journal*, *2*(3), 129-137. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-03-18-0012-R>
- Johnson, N. C. (2010). Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales: Tansley review. *New Phytologist*, *185*(3), 631-647. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03110.x>
- Knight, S. J., Karon, O., & Goddard, M. R. (2020). Small scale fungal community differentiation in a vineyard system. *Food Microbiology*, *87*, 103358. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103358>
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, *5*(1), 14233. <https://doi.org/10.1038/srep14233>
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
- Liang, H., Wang, X., Yan, J., & Luo, L. (2019). Characterizing the Intra-Vineyard Variation of Soil Bacterial and Fungal Communities. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1239. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01239>
- Liu, D., & Howell, K. (2020). Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environmental Microbiology*, 1462-2920.15172. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15172>
- Liu, D., Zhang, P., Chen, D., & Howell, K. (2019). From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2679. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679>
- MacArthur, R.H., and Wilson, E.O., (1967). *The theory of island biogeography*. Princeton university Press.
- Mahé, S., Duhamel, M., Le Calvez, T., Guillot, L., Sarbu, L., Bretaudeau, A., ... Vandenkoornhuysse, P. (2012). PHYMYCO-DB: A Curated Database for Analyses of Fungal Diversity and Evolution. *PLoS ONE*, *7*(9), e43117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043117>
- Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Michoud, G., & Daffonchio, D. (2018). Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome*, *6*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0391-2>
- Martinez-Diz, M. del P., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Díaz-Losada, E., Eichmeier, A., & Gramaje, D. (2019). Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. *Fungal Ecology*, *41*, 234-244. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.07.003>
- Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Guzzetti, L., Galimberti, A., Grando, M. S., Tardaguila, J., & Labra, M. (2018). Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00946>
- Miura, T., Sánchez, R., Castañeda, L. E., Godoy, K., & Barbosa, O. (2017). Is microbial terroir related to geographic distance between vineyards?: Microbial terroir related to geographic distance. *Environmental Microbiology Reports*, *9*(6), 742-749. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12589>
- Morrison-Whittle, P., & Goddard, M. R. (2015). Quantifying the relative roles of selective and neutral processes in defining eukaryotic microbial communities. *The ISME Journal*, *9*(9), 2003-2011. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.18>
- Nakagawa, S., & Schielzeth, H. (2013). A general and simple method for obtaining R<sup>2</sup> from generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution*, *4*(2), 133-142. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x>
- Nicolás, E., Maestre-Valero, J. F., Alarcón, J. J., Pedrero, F., Vicente-Sánchez, J., Bernabé, A., ... Fernández, F. (2015). Effectiveness and persistence of arbuscular mycorrhizal fungi on the physiology, nutrient uptake and yield of Crimson seedless grapevine. *The Journal of Agricultural Science*, *153*(6), 1084-1096. <https://doi.org/10.1017/S002185961400080X>
- Novello, G., Gamalero, E., Bona, E., Boatti, L., Mignone, F., Massa, N., ... Berta, G. (2017). The Rhizosphere Bacterial Microbiota of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir in an Integrated Pest Management Vineyard. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1528. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01528>

- Oliveira, M., Arenas, M., Lage, O., Cunha, M., & Amorim, M. I. (2018). Epiphytic fungal community in *Vitis vinifera* of the Portuguese wine regions. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 93-102. <https://doi.org/10.1111/lam.12826>
- Pacifico, D., Squartini, A., Crucitti, D., Barizza, E., Lo Schiavo, F., Muresu, R., ... Zottini, M. (2019). The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1256. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01256>
- Plassart, P., Prévost-Bouré, N. C., Uroz, S., Dequiedt, S., Stone, D., Creamer, R., ... Lemanceau, P. (2019). Soil parameters, land use, and geographical distance drive soil bacterial communities along a European transect. *Scientific Reports*, 9(1), 605. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36867-2>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., ... Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait: Root bacteria protect plants from drought. *Environmental Microbiology*, 17(2), 316-331. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439>
- Santoyo, G., Hernandez-Pacheco, C., Hernandez-Salmeron, J., Hernandez-Leon, R. (2017) The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1): e03R01
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2009). *Mycorrhizal symbiosis* (3. ed., Repr). Amsterdam: Elsevier/Acad. Press.
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant-microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 607-621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Trouvelot, S., Bonneau, L., Redecker, D., van Tuinen, D., Adrian, M., & Wipf, D. (2015). Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1449-1467. <https://doi.org/10.1007/s13593-015-0329-7>
- van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., & van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(3), 296-310. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- van Leeuwen, C., Roby, J.-P., & De Ressaéguier, L. (2018). Soil-related terroir factors: A review. *OENO One*, 52(2), 173-188. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.2.2208>
- Vandenkoornhuysse, P., Husband, R., Daniell, T. J., Watson, I. J., Duck, J. M., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11(8), 1555-1564. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01538.x>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vannier, N., Mony, C., Bittebiere, A.-K., Michon-Coudouel, S., Biget, M., & Vandenkoornhuysse, P. (2018). A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome*, 6(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0459-7>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: From plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3-17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Werner, G. D. A., & Kiers, E. T. (2015). Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytologist*, 205(4), 1515-1524. <https://doi.org/10.1111/nph.13092>
- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., ... Gilbert, J. A. (2015). The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *MBio*, 6(2), e02527-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>
- Zhang, J., & Elser, J. J. (2017). Carbon:Nitrogen:Phosphorus Stoichiometry in Fungi: A Meta-Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1281. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01281>

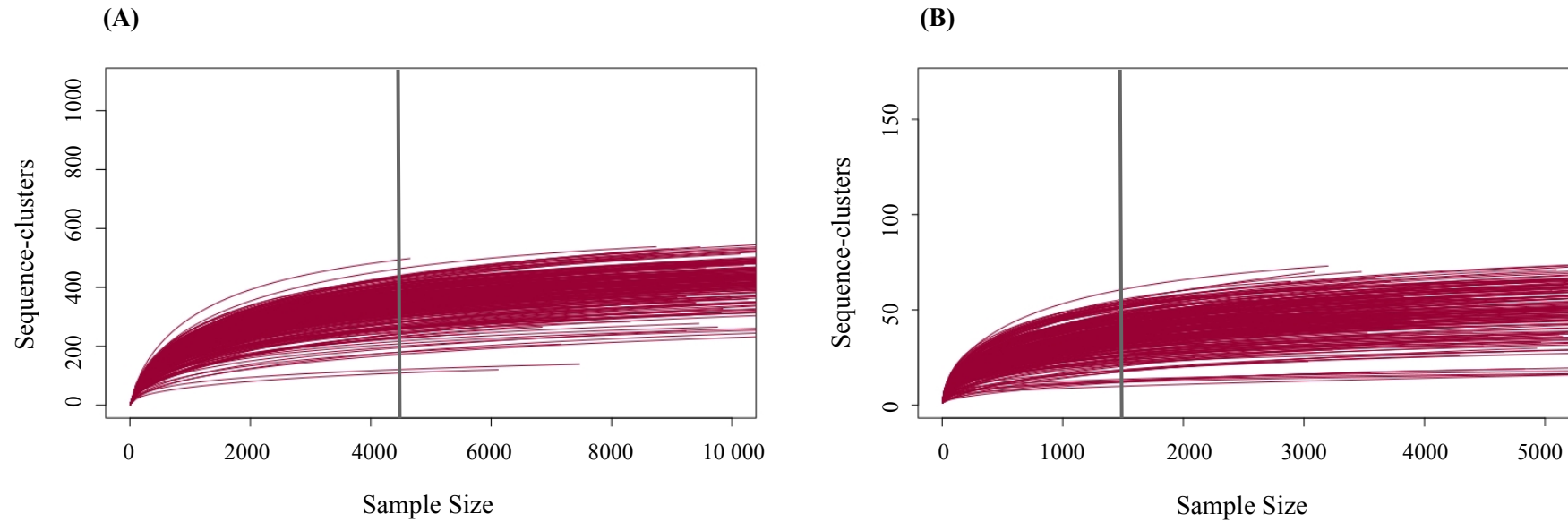


This article is published under the **Creative Commons licence** (CC BY 4.0).

Use of all or part of the content of this article must mention the authors, the year of publication, the title, the name of the journal, the volume, the pages and the DOI in compliance with the information given above.

**SUPPLEMENTARY DATA**

Biget, M., Mony, C., Aubry, M., Jambon, O., Quaiser, A., Chable, V., Pernet, S., & Vandenkoornhuys, P. (2021). The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors. *OENO One*, 55(3).  
<https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4616>



**FIGURE S1.** Rarefaction curves for (A) “all bacteria” samples and (B) “all fungi” samples.

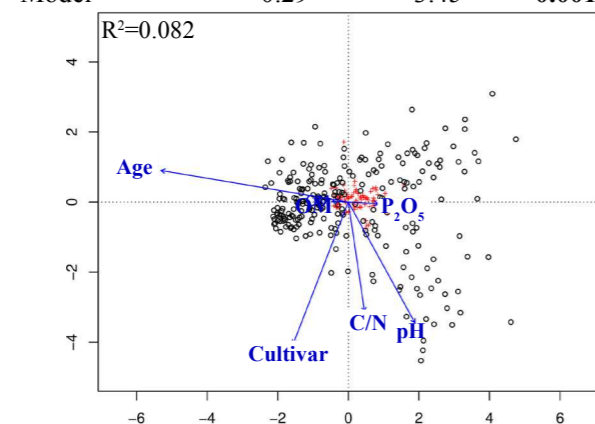
Curves show the total assigned sequence-clusters detected relative to sample size in sequence number. The vertical line corresponds to the number of sequence-clusters at which data were rarefied.

**(A) Alpha-scale (i) Actinobacteria**

CCA (sequence-clusterTable~pH+C/N+OM+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+Age+Cultivar)

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.29 3.45 **0.001\*\*\***

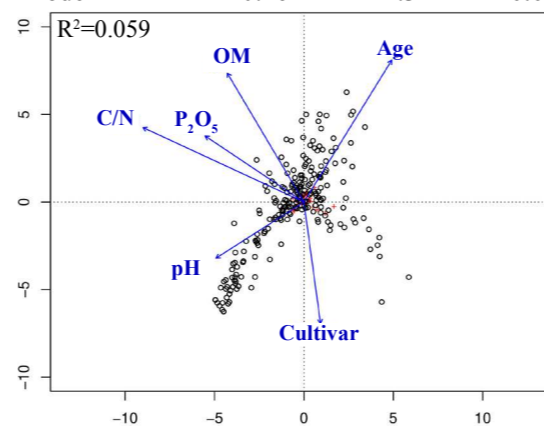


Factors	pH	C/N	OM	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Age	Cultivar
F-value (p)	2.66***	2.81***	2.38**	3.09**	6.39***	3.39***

**(ii) Acidobacteria**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.16 2.32 **0.001\*\*\***

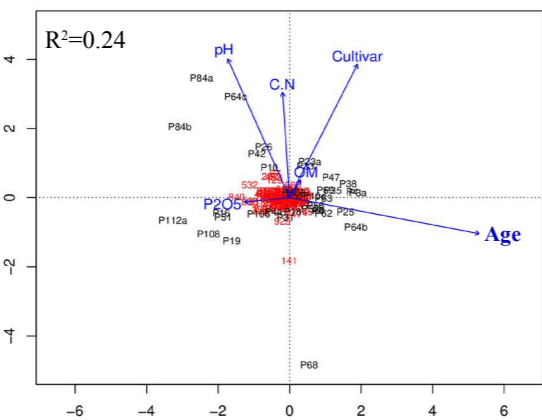


Factors	pH	C/N	OM	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Age	Cultivar
F-value (p)	1.82*	1.94*	3.11**	1.72*	3.12***	2.21**

**(B) Gamma-scale (i) Actinobacteria**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.27 1.40 **0.03\***

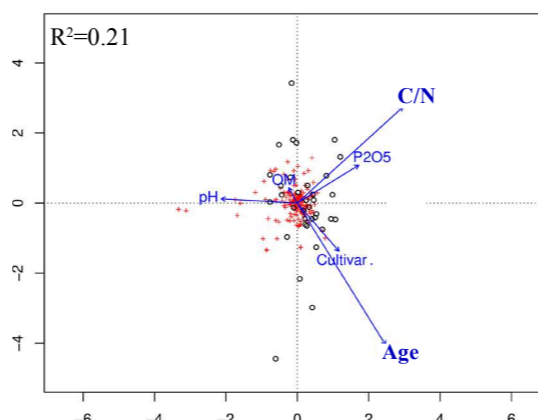


Factors	Age
F-value (p)	2.39**

**(ii) All fungi**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.20 1.27 **0.048\***

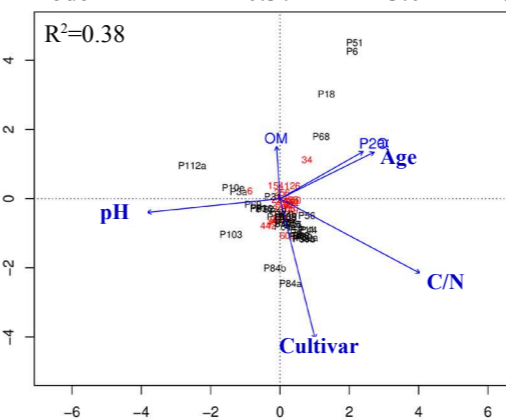


Factors	C/N	Age
F-value (p)	1.90*	1.80*

**(iii) Glomeromycota**

ANOVA	Chisq	F	p-value
-------	-------	---	---------

Model 0.37 3.02 **0.001\*\*\***



Factors	pH	C/N	Age	Cultivar
F-value (p)	2.37*	6.06**	3.30*	3.55**

**FIGURE S2.** Effect of abiotic and plant-specific factors on the composition of the endospheric (A) minor bacterial communities inhabiting the vine plant roots at the  $\alpha$ -scale and (B) bacterial and fungal communities inhabiting the vine plant roots at the  $\gamma$ -scale. Percentages of explained deviance and significance were calculated using ANOVA-like permutation tests with canonical correspondence analysis (CCA).

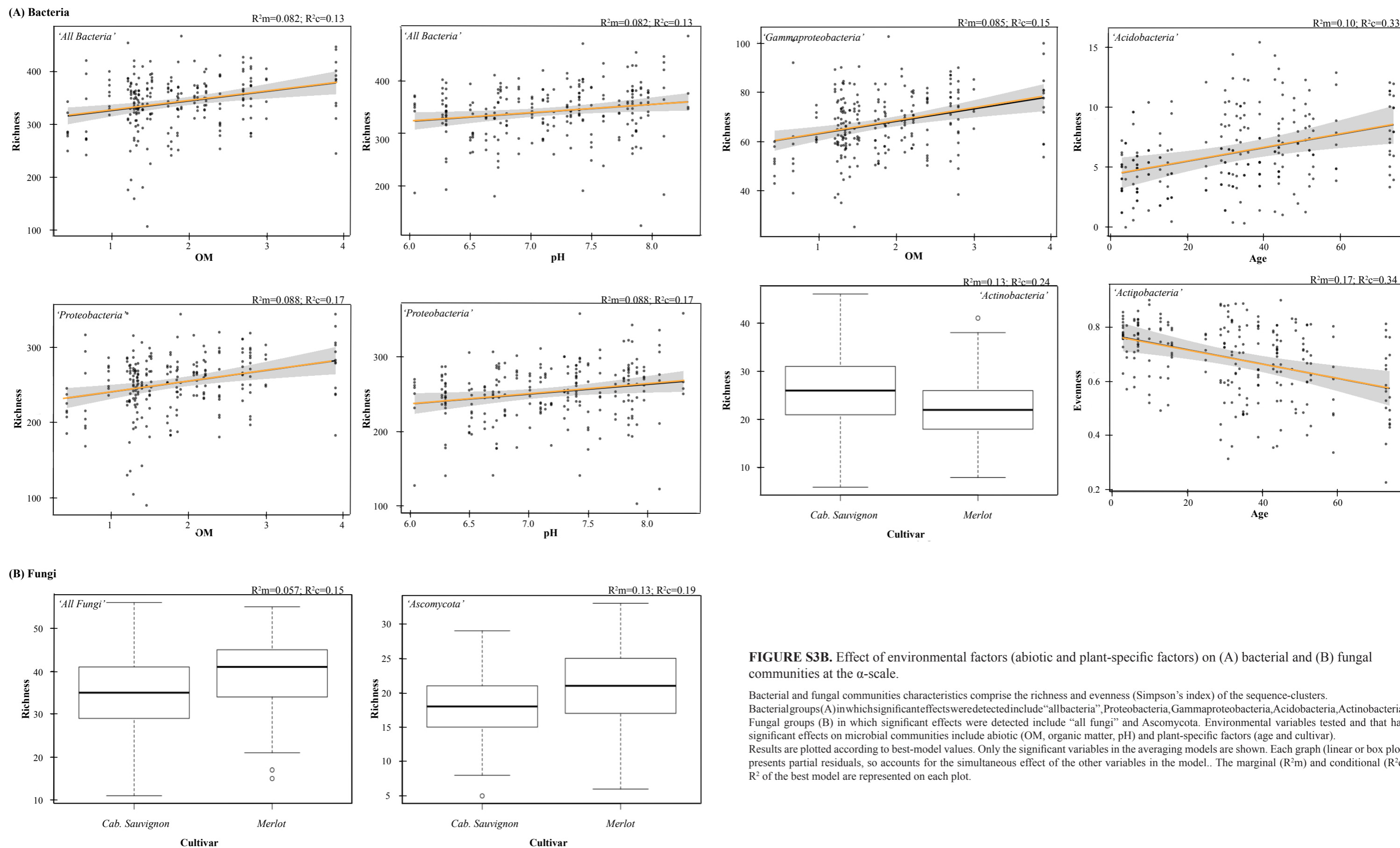
(A) Results of the CCA at the  $\alpha$ -scale for the two minor bacterial phyla. Black dots represent the samples and red cross represent sequence-clusters.

(B) Significant results of the CCA at the  $\gamma$ -scale for the bacterial and fungal communities. Black letters represent the fields and red numbers represent sequence-clusters.

ANOVA tables show the significance for the CCA model.

Factors tested: age of the vine plant, cultivar (Merlot or Cabernet Sauvignon), OM (Organic Matter), C/N ration (carbon/nitrogen ratio), pH and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Factors which significantly influence the microbial composition are reported on tables.

Values are given (F-value) for the “all bacteria” / “all fungi” communities and the associated phyla when the explained deviance is significant (\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01. \*\*\*, P < 0.001).



**FIGURE S3B.** Effect of environmental factors (abiotic and plant-specific factors) on (A) bacterial and (B) fungal communities at the  $\alpha$ -scale.

Bacterial and fungal communities characteristics comprise the richness and evenness (Simpson's index) of the sequence-clusters. Bacterial groups (A) in which significant effects were detected include "all bacteria", Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria. Fungal groups (B) in which significant effects were detected include "all fungi" and Ascomycota. Environmental variables tested and that had significant effects on microbial communities include abiotic (OM, organic matter, pH) and plant-specific factors (age and cultivar). Results are plotted according to best-model values. Only the significant variables in the averaging models are shown. Each graph (linear or box plot) presents partial residuals, so accounts for the simultaneous effect of the other variables in the model. The marginal ( $R^2m$ ) and conditional ( $R^2c$ )  $R^2$  of the best model are represented on each plot.

SUPPLEMENTARY DATA

Biget, M., Mony, C., Aubry, M., Jambon, O., Quaiser, A., Chable, V., Pernet, S., & Vandenkoornhuyse, P. (2021). The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors. *OENO One*, 55(3). <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4616>

**TABLE S1.** Abiotic and plant-specific variables and ranges of variation.

Environmental variables	Abiotic factors				Plant-specific factors		
	Field	% OM	C/N ratio	pH	P2O5 (g/kg)	Age	Cultivar
P103		1.85	11.69	7.73	0.075	15	Cabernet-Sauvignon
P106		1.34	10.82	6.63	0.098	13	Merlot
P108		2.22	12.18	6.3	0.066	7	Cabernet-Sauvignon
P10		3	11.7	7.1	0.163	49	Cabernet-Sauvignon
P10e		1.9	10.4	8.3	0.203	48	Cabernet-Sauvignon
P112a		2.11	6.32	7.97	0.097	7	Cabernet-Sauvignon
P16		2.07	9.19	7.8	0.545	25	Merlot
P18		3.9	12.4	6.5	0.133	43	Cabernet-Sauvignon
P19		1.52	8.66	6.75	0.251	33	Cabernet-Sauvignon
P23a		2.4	10.5	7.1	0.185	53	Merlot
P25		2.8	10.2	6.3	0.174	73	Cabernet-Sauvignon
P26		2.7	13.6	7.4	0.235	73	Merlot
P31		3.9	14.1	6.3	0.231	51	Cabernet-Sauvignon
P33		2.8	10.8	6.9	0.224	31	Merlot
P35		1.77	10.61	6.73	0.218	59	Merlot
P38		2.7	10.6	7.3	0.244	74	Merlot
P3a		2.4	12.9	7.5	0.18	35	Cabernet-Sauvignon
P42		1.86	11.38	7.84	0.354	39	Merlot
P44		1.4	12.7	6.7	0.155	6	Cabernet-Sauvignon
P47		0.67	12.17	7.87	0.133	10	Merlot
P4		1.31	16.56	7.14	0.143	36	Merlot



SUPPLEMENTARY DATA

Biget, M., Mony, C., Aubry, M., Jambon, O., Quaiser, A., Chable, V., Pernet, S., & Vandenkoornhuyse, P. (2021). The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors. *OENO One*, 55(3). <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.3.4616>

P51	1.46	10.48	7.91	0.258	16	Cabernet-Sauvignon
P52a	1.5	12	7.6	0.156	30	Merlot
P56	1.32	9.25	7.33	0.111	52	Cabernet-Sauvignon
P57	1.21	8.48	7.43	0.144	32	Cabernet-Sauvignon
P62	1.24	9.49	7.19	0.126	4	Merlot
P63	1.29	7.21	8.1	0.106	44	Merlot
P64b	0.43	4.46	6.52	0.047	34	Merlot
P64c	0.97	9.25	6.27	0.048	44	Merlot
P68	1.25	8.97	6.04	0.235	39	Cabernet-Sauvignon
P69	1.29	11.03	7.01	0.127	29	Merlot
P6	2.2	11.2	6.8	0.228	45	Cabernet-Sauvignon
P84a	1.35	12.46	7.4	0.212	3	Merlot
P84b	1.73	12.27	7.84	0.173	3	Cabernet-Sauvignon
P11	2.6	11.3	7.3	0.168	80	Merlot
P58a	3.69	11.85	7.15	0.091	19	Cabernet-Sauvignon
P59b	1.6	9.12	6.63	0.104	26	Merlot
<b>Mean (SD)</b>	1.94 (0.84)	10.76 (2.21)	7.15 (0.59)	0.17 (0.09)	35 (21)	NA
<b>Min</b>	0.43	4.46	6.04	0.05	3	NA
<b>Max</b>	3.90	16.56	8.30	0.55	80	NA

Values of abiotic and plant-specific factors are detailed for each field as well as the mean, minimum and maximum of the values.

OM: organic matter, SD: standard deviation

SUPPLEMENTARY DATA

Biget, M., Mony, C., Aubry, M., Jambon, O., Quaiser, A., Chable, V., Pernet, S., & Vandenkoornhuyse, P. (2021). The drivers of vine-plant root microbiota endosphere composition include both abiotic and plant-specific factors. *OENO One*, 55(3). <https://doi.org/10.20870/oenone.2021.55.3.4616>

**TABLE S2.** Summary of the sequence-cluster richness and evenness indexes for (A) bacterial and (B) fungal communities.

(A) Bacteria	Alpha scale		Gamma scale		Evenness (Simpson)	Alpha scale		Gamma scale	
	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range		Mean (SD)	Range	Means(SD)	Range
Richness	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Evenness (Simpson)	Mean (SD)	Range	Means(SD)	Range
All bacteria	340.41 (54.27)	108-490	747.26 (72.26)	598-881	All bacteria	0.96 (0.04)	0.60-0.99	0.98 (0.01)	0.97-0.99
Proteobacteria	252.27 (41.98)	86-365	535.88 (51.48)	420-629	Proteobacteria	0.95 (0.05)	0.51-0.99	0.97 (0.01)	0.95-0.98
<i>Alphaproteobacteria</i>	154.7 (24.7)	61-211	308.62 (29.8)	252-359	<i>Alphaproteobacteria</i>	0.93 (0.05)	0.50-0.98	0.95 (0.01)	0.92-0.97
<i>Gammaproteobacteria</i>	67.3 (13.4)	24-104	152.74 (14.9)	108-177	<i>Gammaproteobacteria</i>	0.85 (0.09)	0.23-0.96	0.90 (0.04)	0.83-0.95
<i>Deltaproteobacteria</i>	30 (10)	1-53	73.88 (11.1)	55-92	<i>Deltaproteobacteria</i>	0.85 (0.11)	0-0.96	0.92 (0.04)	0.82-0.97
Bacteroidetes	50.3 (11.4)	13-82	120.32 (13.63)	93-144	Bacteroidetes	0.89 (0.08)	0.36-0.97	0.94 (0.02)	0.90-0.97
Actinobacteria	24.1 (6.9)	6-46	54.41 (8.52)	34-67	Actinobacteria	0.68 (0.16)	0.24-0.96	0.72 (0.12)	0.45-0.89
Acidobacteria	6.2 (3.7)	0-16	16.94 (5.3)	6-25	Acidobacteria	0.64 (0.23)	0-1	0.81 (0.11)	0.51-0.92
<b>(B) Fungi</b>									
Richness	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Evenness (Simpson)	Mean (SD)	Range	Means(SD)	Range
All fungi	37.46 (9.1)	11-56	94.89 (11.36)	71-121	All fungi	0.59 (0.18)	0.06-0.87	0.68 (0.11)	0.30-0.82
Ascomycota	19.54 (5.14)	5-33	48.83 (6.50)	38-60	Ascomycota	0.42 (0.18)	0.01-0.80	0.48 (0.12)	0.16-0.70
Basidiomycota	9.31 (3.47)	0-19	23.22 (3.47)	16-30	Basidiomycota	0.55 (0.20)	0-1	0.71 (0.12)	0.34-0.85
Glomeromycota	5 (2.39)	0-14	12.92 (2.99)	8-18	Glomeromycota	0.38 (0.21)	0-1	0.43 (0.15)	0.10-0.68

The values are calculated for the “all bacteria” / “all fungi” communities and the associated phyla.

Mean, standard deviation (SD), and the range of the values (minimum-maximum) are shown for both the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -scale





## CHAPITRE 3.2 - DYNAMIQUE TEMPORELLE

La variabilité intra- et inter-annuelle des communautés microbiennes de l'endosphère racinaire de *Vitis vinifera* est principalement déterministe



### **Résumé du Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne**

Les communautés microbiennes fournissent des fonctions essentielles aux plantes et sont donc de première importance pour la production végétale. Malgré son importance, la compréhension des règles d'assemblage du compartiment microbien associé aux plantes est encore relativement incomplète et de nombreuses études tentent de percer les mystères du microbiote des plantes ainsi que des facteurs qui le façonnent.

Le microbiote des plantes varie dans l'espace et dans le temps et est principalement recruté, de façon active et déterminée, à partir du sol qui est le réservoir primaire de microorganismes. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études ont cherché à analyser la répartition spatiale des microorganismes et ont montré l'existence de patrons biogéographiques dans l'assemblage des communautés microbiennes. Cependant, dans la plupart des études, la composante temporelle est généralement éludée en dépit de son rôle crucial dans la dynamique de structuration des communautés microbiennes.

Des expériences ont démontré que le microbiote des plantes variait entre les saisons et les années. Derrière ces variations, les études ont montré que le stade de développement de la plante conditionne son microbiote. Ces observations peuvent être expliquées par des modifications des besoins de la plante selon son stade de développement/maturation ou par la modification de l'architecture de l'appareil racinaire au cours du temps. De plus, des changements progressifs du microbiote peuvent se produire sous pression de sélection de la plante hôte ("host preference") au cours du temps, au détriment des microorganismes pionniers ("priority effect"). La structure des communautés de microorganismes peut également varier selon les modifications de conditions de l'environnement (ensoleillement, précipitations et variations des paramètres physico-chimiques).

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur le microbiote endosphérique racinaire, la fraction la plus intime des microorganismes associés aux plantes et avons analysé les variations temporelles du microbiote endophytique des plantes. Nous avons émis les hypothèses que la composition des bactéries et des champignons du microbiote de la vigne variait en fonction (i) de la date analysée et (ii) de l'année d'échantillonnage. Nous avons également émis l'hypothèse (iii) de différences entre les saisons plus prononcées que la variation annuelle (même date d'échantillonnage sur deux années) du fait d'un fort impact du stade de développement annuel de la plante couplé à des modifications des paramètres du sol selon la période de l'année.

De plus, si ces changements dans le temps se produisent en réponse à des pressions environnementales, on peut émettre l'hypothèse (iv) de changements déterministes des communautés microbiennes (i.e. l'hypothèse nulle étant un assemblage aléatoire).

Afin de répondre à ces hypothèses, nous avons échantillonné les racines de 8 pieds de vigne équidistants au sein de 25 parcelles (nombre équilibré de parcelles plantées avec les cépages

Cabernet-Sauvignon et Merlot) à trois dates sur deux ans (variations intra- et inter-annuelles): Septembre 2018, Juin 2019 et Septembre 2019. De ces échantillons, nous avons analysé, par séquençage massif, les fragments d'amplicon du gène de l'ARNr SSU (bactéries et champignons) dérivés de l'endosphère racinaire des 200 échantillons prélevés. Nous avons ensuite comparé les variations temporelles du microbiote en combinant une analyse multivariée (composition microbienne; analyse en coordonnées principales - PCoA) et des modèles mixtes linéaires (richesse microbienne). De plus, nous avons utilisé un modèle neutre (le modèle de Sloan - neutral model community (NMC)) afin de déterminer la part des processus déterministes dans l'assemblage des communautés microbiennes du microbiote de l'endosphère des racines.

Dans cette étude, nous avons démontré l'existence de patrons temporels hautement conservés entre les deux cépages analysés dans la structuration des communautés bactériennes et fongiques. Les résultats montrent que la composition bactérienne et fongique est similaire entre les deux dates de septembre. En particulier, nous avons démontré une plus grande richesse en Actinobactéries et une plus faible richesse en Gloméromycètes en septembre 2018 et 2019 (fruits matures) en comparaison à la campagne de juin (floraison de la vigne). Par ailleurs, nous avons remarqué que les patrons saisonniers étaient plus marqués chez les champignons en comparaison aux bactéries chez lesquelles, les modèles de variations à l'échelle du phylum n'étaient pas aussi clairs entre les saisons et les années.

De plus, nous démontrons une forte proportion de taxa bactériens de l'endosphère racinaire dont l'assemblage non aléatoire semble indiquer une influence déterministe de la plante ou de modifications saisonnières de l'environnement dans le recrutement microbien.

Notre plan d'échantillonnage temporel nous a permis d'étayer un peu plus les connaissances sur les mécanismes temporels régissant les assemblages microbiens. Nous démontrons des relations étroites et déterministes entre ces assemblages, la phénologie de la plante et l'adaptation aux variations saisonnières des conditions environnementales. Notre étude souligne les interactions complexes mises en place entre un hôte et son microbiote au cours du temps et renforce l'importance d'améliorer les connaissances sur le réservoir microbien, dans lequel les plantes puisent et organisent leur microbiote, afin de promouvoir la viticulture durable et plus largement, l'agriculture de demain.

**Intra- and inter-annual changes in root endospheric microbial communities of *Vitis vinifera* are mainly determinist**

Marine Biget<sup>1</sup>, Cendrine Mony<sup>1</sup>, Adèle Miteul<sup>1\*</sup>, Olivier Jambon<sup>1</sup>, Romain Causse-Védrine<sup>2</sup>, Sophie Michon-Coudouel<sup>2</sup>, Maxime R. Hervé<sup>3</sup>, Véronique Chable<sup>4</sup>, Sabrina Pernet<sup>5</sup>, Philippe Vandenkoornhuyse<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Université de Rennes 1, CNRS, ECOBIO (Ecosystèmes, biodiversité, évolution) - UMR 6553, F-35000 Rennes, France

<sup>2</sup> Plateforme EcogenO, Université de Rennes 1, CNRS, - UMS 3343 OSUR, F-35000 Rennes, France

<sup>3</sup> IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35000, Rennes, France

<sup>4</sup> UMR BAGAP INRAE, Centre Bretagne-Normandie, France

<sup>5</sup> Château Palmer, lieu dit Issan, Margaux, France

**Running title :**

**Intra- and inter-annual changes in root microbiota**

#Address correspondence to Philippe Vandenkoornhuyse [philippe.vandenkoornhuyse@univ-rennes1.fr](mailto:philippe.vandenkoornhuyse@univ-rennes1.fr)  
UMR 6553 Ecobio, CNRS - University of Rennes 1, Avenue du General Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France – Phone : +33 (0)2.23.23.50.07

\*Present address : Adèle Miteul, Université Laval - Pavillon : Paul Comtois - Sciences de l'Agriculture et de l'alimentation- 2425 Rue de l'Agriculture, Québec, QC G1V 0A6

~ *Submitted to mSystems Journal* ~



## Abstract

Microbial communities provide essential services to plants and are therefore crucial for crop production, including grapevine. Understanding how microorganisms assemble is one of the main challenges in microbial ecology today. While many studies have assessed spatial microbial assembly, temporal dynamics are still overlooked. Depending on the plant development stage, temporal changes in microbiota are expected through changes in plant needs and in root architecture, and environmental pressures. We analyzed the composition of microbiota in two cultivars in a single vineyard at three dates over a period of two growing years to investigate microbial temporal variability (intra- and inter-annual variations). Highly conserved temporal patterns were found in the two cultivars. Intra-annual changes in microbial community composition were recorded between June (i.e. flower set) and September (i.e. mature grapes) whereas convergent microbial communities were observed on the two September dates. In particular, the increase in Actinobacteria and decrease in Glomeromycota in September were interpreted as shifts in the microbiota community patterns related to plant physiological requirements. We also demonstrated a high proportion of non-random assembly of root endosphere bacteria, underlining the deterministic influence of the plant or the environment in microbial recruitment over time. Our study suggests an intra-annual rhythm of microbiota shifts, marginally random, hence a succession within the root-microbiota endosphere governed by active plant filtering. A better knowledge of the microorganisms reservoir, from which plants draw and organize their microbiota, will be important for future viticulture and for a broader view of agriculture in the context of global warming.

## Importance

The importance of microorganisms in ecological plant functions, growth and productivity is well established. Different studies have emphasized the spatial heterogeneity of microbial communities that define the *spirit* of specific production areas, and have introduced the *microbial terroir* of vineyards. However, microbial assembly is also influenced by temporal fluctuations, including annual changes and seasonal variability, through environmental changes and plant development, which can have major impacts on wine vintage and thus, on the *microbial terroir*. The importance of our research is we identified clear modifications in root-endosphere microbiota assembly depending on the growing period of the grapevine and deterministic changes in bacterial communities. The inter-annual resemblance of the microbiota can also be seen as empirical evidence of deterministic selection during plant growth and development. Our findings advance our understanding of the temporal dynamics and determinism of microbiota and question the idea of an existing *microbial terroir* from a new viewpoint.

**Keywords** root microbiota, endosphere, grapevine, temporal dynamics, deterministic assembly

## Introduction

Plant development and survival are largely dependent on a remarkable diversity of microorganisms (e.g. 1–3). These microorganisms, either epiphytes or endophytes, can live in all plant organs and tissues. All plants worldwide are colonized by many different types of microorganisms, the most frequently studied being bacteria and fungi (4). The plant associated microorganisms that form plant microbiota are deeply involved in supplying the plant with water and nutrients (e.g. 5). They help their host face biotic and abiotic stresses such as drought and solar radiation (6–8). Despite the importance of the microbial compartment for plant growth, our understanding of microbiota assembly and its related functions remains insufficient, and is one of the crucial challenges of microbial ecology research today.

The microorganisms that colonize internal plant parts originate from the environment, mostly from the soil, which thus serves as a microbial reservoir (1, 9, 10). The processes behind plant colonization that shape microbial assemblage composition are thought to be mainly deterministic, i.e. shaped by host selection (11, 12). Deterministic processes are assumed to be primarily linked to plant-microorganism interactions. However, randomness and neutral processes can occur (13). There is empirical evidence that microbial communities vary over time, both between seasons and even among years in the case of perennial species (9, 14, 15). Two main mechanisms are thought to be related to these temporal fluctuations.

The development stage of the plant influences plant microbiota (16–21). This can be explained by changes in plant needs which thus modify the microbial assemblages recruited by the plants at the rhizosphere stage and inside the roots (18, 22). Gradual changes may also occur ranging from random colonization by species living close to the roots to preferential selection of particular species by plants (i.e. host plant preference in 23) and filtration by preferential carbon allocation to the best cooperators (24) (i.e. determinist changes). Microbiota modifications can be also linked to the development of new roots to colonize and to temporal modifications in root characteristics, shape, and functions that may modify the space available for microbial colonization (25–27).

The temporal dynamics of plant microbiota is also influenced by environmental pressures (e.g. 15, 28). For instance, in one year, climate conditions may be highly contrasted in different seasons, resulting in changes in soil parameters (e.g. water availability, pH, C/N ratio). These environmental changes over the year can lead to dynamic changes in the reservoir of recruitable microorganisms, and hence in the composition of microorganisms recruited by the plant. In addition, plants respond to changes in environmental conditions and buffer abiotic stresses by recruiting particular microorganisms from the soil reservoir (29, 30). However, so far, very few studies have investigated temporal variations in plant microbiota, particularly those of the most intimate fraction of the plant microbiota, the endosphere. Using grapevine as a model to assess the endospheric microbiota dynamics has a number of advantages,

## Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

notably they are perennial, genetically homogeneous and vines grown at one location are usually managed very similar.

To better understand the dynamics that structure the microbial communities of the grapevine root endosphere, we hypothesized that the composition of both the bacteria and fungi on the grapevine vary depending on (i) the growing period and (ii) the year of sampling. Assuming the existence of a major impact of the plant development stage as well as of modifications in the soil parameters in the different seasons, we also hypothesized that (iii) differences between growing periods would be more pronounced than annual variations (same sampling date in two different years). Furthermore, if these temporal changes occur as a response to environmental constraints (changes in plant selection and abiotic conditions), we finally hypothesized (iv) these changes are deterministic (the null hypothesis being a random assembly of the plant microbiota). To test these hypotheses, we sampled roots in a single vineyard located in Margaux (France) where the bedrock is considered to be homogeneous and vineyard management is similar among fields. The root endosphere of two cultivars (Cabernet Sauvignon and Merlot) was sampled on three different dates and analyzed using specific microbial SSU rRNA gene amplicon fragments (bacteria and fungi) (Figure 1).

### Results

#### Description of the microbial composition of root endosphere

The Cabernet Sauvignon (CS) matrices contained 945 (12 fields, 288 samples) and 523 (12 fields, 278 samples) bacterial and fungal sequence clusters respectively while the Merlot (M) matrices contained 943 (13 fields, 307 samples) bacterial sequence clusters and 519 (13 fields, 519 samples) fungal sequence clusters.

The endospheric bacterial assemblage of the Cabernet Sauvignon was mainly composed of Alphaproteobacteria (sequence cluster richness - S18: 403, J19: 394, S19: 394; relative abundance - S18: 44.6%, J19: 41.6%, S19: 46.1%), Gammaproteobacteria (sequence cluster richness - S18:189, J19:183, S19:186; relative abundance - S18: 23.8%, J19: 36.7%, S19: 24.1%) and Bacteroidota (sequence cluster richness - S18: 172, J19: 171, S19: 168; relative abundance - S18: 11.3%, J19: 11.6%, S19: 10%) (Figure 2A; Table S1A). Interestingly, we found a larger proportion of Gammaproteobacteria in J19 and a smaller proportion of Actinobacteria, for similar richness (sequence cluster richness - S18: 82, J19: 78, S19: 82); relative abundance - S18: 16.3%, J19: 5.7%, S19: 16.4%) (Figure 2A; Table S1A). We observed similar trends in Merlot (Figure 2B; Table S1A).

The endospheric fungal microbiota of Cabernet Sauvignon was mainly composed of Ascomycota with similar sequence cluster richness on the three sampling dates (sequence cluster richness - S18: 363, J19: 359, S19: 363) but variable relative abundances (relative abundance - S18: 83.7%, J19: 62.4%, S19:

### Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

79.4%) (Figure 2C; Table S1B). Like Ascomycota, Glomeromycota showed constant richness over time (sequence cluster richness - S18: 44, J19: 45, S19: 44) but marked variations in relative abundance (relative abundance - S18: 2.8%, J19: 18.2%, S19: 7.7%) (Figure 2C; Table S1B). Similar trends were again found in Merlot (Figure 2D; Table S1B).

To identify both the core microbiota and the specific sequence clusters associated with the date of sampling, we analyzed the composition of the root-endospheric microbiota using Venn diagrams (Figure 3). A total of 907 bacterial sequence clusters of both CS and M and 497 and 496 fungal sequence clusters of CS and M respectively were common to all dates, while ~2% of sequence clusters were specific to a sampling date (Figure 3). Six bacteria genera and one bacteria genus were indicators of the S18 and J19 campaigns respectively for both cultivars (*Hirschia*, *Brevundimonas*, *Ideonella*, *Pedobacter*, *Flavobacterium*, *Vermiphilaceae unknown genus* (S18) and *Comamonadaceae unknown genus* (J19)) (Figures 3A, B; Table S3). Concerning the fungal communities, specific sequence clusters were mainly represented by the Pezizomycotina and Agaricomycetes fungal orders with particular genera depending on the sampling date (Figures 3C,D; Table S3). We found only one specific sequence cluster (*Armillaria*) shared by the two cultivars, which defined the S18 sampling date (Figures 3C,D; Table S3).

#### **Effect of the sampling date on microbial community composition and richness**

In agreement with hypotheses 1 and 2, the PCoA analyses demonstrated clear differences in both bacterial and fungal communities between sampling dates, whatever the cultivar ( $p < 0.001^{***}$ ; Figure 4). The effect of the sampling date explained 44.2% and 41.6% ( $R^2$  in figure 4A, B) of the variance of the bacterial community and 25.2% and 26.9% of the variance of the fungal community ( $R^2$  in figure 4C, D) in Cabernet Sauvignon and Merlot respectively.

In agreement with hypothesis 3, the univariate models demonstrated that differences in the fungal community of grapevine root endosphere were more pronounced between growing periods than annual variations whatever the cultivar (see Figure 5C, D, and Table S2 for detailed richness values). The richness of the fungal microbiota (“all fungi”) was mainly explained by Ascomycota (the most numerous in terms of richness), and richness was lowest in J19. Reciprocally, Glomeromycota richness was significantly higher in J19 (Figure 5C, D). In contrast to fungi, bacteria showed no clear pattern of variation between dates, except for Actinobacteria (lowest richness in J19 whatever the cultivar; Figure 5A, B). Gammaproteobacteria, Bacteroidota and Myxococcota were richer in J19 than in S18 and S19 but only in the Merlot cultivar (Figure 5B).

### **Effect of sampling date on the stochastic and deterministic assemblages of the microbial communities**

To decipher the stochastic and deterministic processes in shaping microbial communities depending on the sampling date, we conducted neutral model community analyses (NMC) (Figures 6A, B). Overall, the occurrence frequency of bacteria analyses was correctly predicted by the neutral model ( $R^2=35.5\sim 43.9$  for Cabernet Sauvignon and  $R^2=29.5\sim 44.1$  for Merlot; Figures 6A, B). However, for the fungal taxa, we found no proper fit with the model (negative  $R^2$  values Figure S4A,B), except for the J19 and S19 community analyses ( $R^2=14.8$  and  $R^2=6.14$ ; Figure S4A) and the J19 community analyses ( $R^2=15.5$ ; Figure S4B) for Cabernet Sauvignon and Merlot, respectively.

In the two grapevine cultivars and on all three sampling dates, some sequence clusters of bacterial taxa occurred more frequently (10.7 to 53.9%, yellow dots) or less frequently (30.1 to 42%, green dots) than predicted by the neutral models (Figures 6A,B, single bar charts). The yellow sequence clusters suggest active selection and maintenance by the host plant while the green taxa suggest active selection against the host (Figures 6A, B). The stochastic fraction accounted for from 13.6 to 56.9% of cumulative microbial occurrence, thereby rejecting the null hypothesis of random assembly of the plant microbiota (hypothesis 4) Figures 6A, B, single bar charts).

Community composition defining the three classes (above, below and neutral partitions) was not evenly distributed among phyla (figure 6A,B, combined bar charts). Clear differences were observed for Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacteroidia as well as Actinobacteria between the two deterministic partitions (Figures 6A, B, “above” and “below” in the combined bar charts) indicating that some sequence clusters within a taxonomic group were deterministically selected and maintained by the host plant while others were negatively influenced by the host plant or by the local environment (Figures 6A, B, “above” and “below” in bar charts).

## **Discussion**

### **Composition of the grapevine root endosphere**

In this study, we analyzed the bacterial and fungal communities inhabiting the root endosphere and deciphered the temporal dynamics that structure grapevine microorganisms at the level of a vineyard. A total of 947 bacterial and 529 fungal sequence clusters composed the grapevine root endospheric microbiota. Proteobacteria (Alphaproteobacteria (higher proportion) and Gammaproteobacteria) and Ascomycota were the main phyla forming the root endospheric microbiota in the grapevines in line with the results of most studies that analyzed grapevine microbial communities in different bio-compartments (for a review, see 28). Although the microbial composition of the main phyla remained

stable and was similar to that described in most microbial studies of grapevine, we observed specific changes in phyla abundances depending on the sampling date.

### **Intra- versus inter-annual variations affect both microbial composition and richness**

In this present study, as expected, we observed consistent changes in the microbial communities of the grapevine roots depending on the sampling date, with changes in the composition, richness and selection of specific taxa. In both cultivars, we showed that intra-annual variations in the composition of microbial communities in the same year (June and September 2019) were stronger than those observed in a given growing period in two different years (September 2018 and September 2019). A recent study showed that the year strongly affected rhizospheric bacterial and fungal richness in the two vineyards analyzed (14). These authors also analyzed the composition of the rhizospheric microbiota at two sampling dates (June and November) of the same year and found differences in fungal diversity at the two dates but did not conclude whether intra-annual variability was higher than inter-annual variability (14).

In the present study, the composition of the bacterial community was influenced by the sampling date. In particular, we observed that Actinobacteria were significantly richer in September than in June, whereas Bacteroidota and the Myxococcota were richer in June the latter particularly in the Merlot cultivar. Actinobacteria have been reported to improve plant mineral and hydric nutrition (31) and may thus have been recruited by the plant in greater numbers in September to buffer abiotic stresses at the end of the summer. Furthermore, some species, particularly *Streptomyces*, are known to control pathogens by producing antibiotic molecules (32, 33). Thus, *Streptomyces* help control phytopathogens and plant diseases. We detected specific *Streptomyces* sequence clusters on the two September sampling dates (the same clusters were identified in September 2018 and September 2019). Because the critical development stage of grapevines is at the end of grape ripening, it is possible that the plants secrete specific exudate compounds to recruit Actinobacteria to face biotic stresses. The increase in Bacteroidota in June can be explained by their role in plant nutrition: Bacteroidota have been reported to be involved in organic phosphorus mineralisation (34). Recruiting Bacteroidota in June, when the plants reach their highest vegetative growth phase, may help face increasing demand for mineral nutrition. Changes in bacterial communities between the flowering and the harvest periods (mature grapes) appeared to be in line with developmental grapevine stages, both involving differential plant needs.

The composition of the fungal community was also strongly influenced by the sampling date, with higher Basidiomycota and Glomeromycota richness in June and higher Ascomycota richness in September. A recent study investigated intra-annual changes in fungal communities of different bio-compartments which support our results on the root endosphere (15). These authors highlighted effects of the grapevine habitat and of the plant development stage in structuring the composition of the

mycobiota and in modifying fungal diversity. They correlated weather conditions with changes in fungal composition and observed dramatic changes in microbiota composition and diversity especially at the veraison stage, just after the fruit set period (15). Glomeromycota forming arbuscular mycorrhiza (AM) are known to be involved in supplying minerals and water to plants and in improving resistance to plant diseases (5). Thus, changes in the patterns of AM fungal community composition over time that have already been evidenced (e.g. 23, 35) may be correlated with the plant development stage and plant requirements over the seasons. Beyond this aspect, the shifts in AM symbiosis composition may be partly attributable to a demonstrated priority effect (i.e. the effect of order of arrival on subsequent community development) (13).

Many endospheric Basidiomycota and Ascomycota that form positive associations with plants (i.e. endophytic fungi) are known as plant “protective agents” (36) that promote plant resistance to environmental stresses including drought, salinity, heat, insects, and pathogens (36, 37). Although examples of vertically transmitted fungal endophytes are well documented (e.g. 38), most fungal endospheric microorganisms are recruited by their host plant from the soil reservoir of microorganisms. For instance, under drought conditions, rice has an enriched fungal endosphere that has been interpreted as positive recruitment to buffer drought conditions (39). The variations observed in Basidiomycota and Ascomycota in the present study may thus not only be explained by the developmental stage of the grapevine but also by the biotic and abiotic stresses that the host plant is facing or has experienced. More generally, changes in root-endosphere community composition over time raise the question of the extent of the determinism in the process of assembly. Experimental mechanistic approaches to both the bacterial- and fungal-root endosphere, for instance using controlled synthetic communities, would be needed to confirm these knowledge-based interpretations.

### **Stochastic versus deterministic process of assembly of the grapevine root endosphere over time**

Recent advances in statistical analyses make it possible to separate deterministic and stochastic processes of assembly using a null model framework (40) (see Materials and Methods for the rationale). For fungi, the absence of a fit of the neutral model community (NMC) analysis did not allow partitioning with statistical support for stochastic and deterministic processes of assembly. Conversely, in this NMC analysis, for bacteria, we were able to show that the deterministic part accounted for 43 to 84% for the two cultivars (Fig 6). The bacterial-endosphere composition was thus dominated by a deterministic assembly process mostly due to active rejection of bacteria by the host (see bar charts showing the cumulative occurrence frequencies of sequence clusters in Fig 6), and to a lesser extent to sequence clusters actively maintained and selected by the host plant. These results suggest finely tuned filtering of bacteria over time. The specific selection of key taxa by the host plant can be interpreted as a process to face particular environmental conditions or to meet specific needs. There is increasing evidence for selection and regulation of rhizospheric microbial communities through root exudates (18,

41–44). Depending on their development stage, plants can secrete different types of compounds, including specific sugars and amino acids as well as more complex secondary metabolites (e.g. 45–47), that act as signals for microbial assemblages of the rhizosphere habitat (18). Modifications in rhizosphere microbiota and in plant microbiota evidenced over time may thus be a consequence, at least partially, of changes in the root secondary metabolites excreted (45, 48, 49). Since the rhizosphere is the antechamber of the endosphere, together with the plant immune system and the mechanism of preferential C allocation to the best cooperators (24, 50) this process would explain the determinism observed in microbiota assembly in root-endosphere samples.

In bacteria, a pattern shared by the two cultivars and all three sampling dates was the abundance of Alphaproteobacteria in the above deterministic fraction (i.e. in clusters that are actively selected by the plant), and of Bacteroidota in the below deterministic fraction (i.e. in clusters that are actively selected against the plant). We also showed that specific taxa acted as key signatures of the deterministic fraction at each sampling date. Notably, Actinobacteria were identified as bacteria selected by the plant only at the two September dates. Overall, the deterministic fraction included a large number of species, some of them rare (e.g. *Polyangia* and *Thermoleophilia*).

### **Convergence of temporal shifts between the two cultivars**

A key result of this work is the convergence of the temporal dynamics of microorganisms between the two cultivars, Cabernet Sauvignon and Merlot. The high convergence between cultivars may reflect similar mechanisms that occurring during microbial recruitment depending on plant development or environmental conditions, and can be interpreted as empirical evidence for deterministic selection during plant growth and development. This interpretation is in agreement with recent findings in the maize microbiome, i.e. the plant developmental stage as the driver of differentiation in ecological functions of the plant-microbiota and consequently of the recruited microorganisms that form this microbiota (51).

The root microbiota has been characterized as a combination of dynamic processes (primary colonization of microbes from the surrounding soil followed by host recruitment (29)). Our results suggest that these mechanisms – priority effect and host preference – are likely to be similar in the type of the cultivar analyzed and to depend to a great extent on the development of the host plant. As the two cultivars were growing in the same environmental conditions, this suggests that microbial dynamics are little influenced by genetic differences between the two cultivars. Although variations in microbial composition depending on the type of cultivar and on the genotype have been proposed, most of the work done so far acknowledged that the geographical location and local environmental conditions (climate/soil parameters) had a bigger impact on microbial assembly (9, 52–54). Our study reinforces these conclusions because the two cultivars analyzed responded in the same way: the same key intra- and inter-variations in the microbial structure. To confirm our results, the temporal dynamics of the



## Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

microbiota should now be tested on a larger number of cultivars at a given location under similar viticultural practices.

### Conclusion

The study of microbial temporal dynamics advanced our understanding of the mechanisms governing their assemblages and demonstrated a tight relationships between microbial assemblages and plant phenology and adaptation to environmental conditions. We observed similar patterns in the two cultivars, with deterministic recruitment of specific microorganisms and similar microbial communities at the same developmental stage. Beyond this framework, our understanding of the mechanisms behind the deterministic changes, including the relative effect of the host plant versus abiotic conditions, remains incomplete. Our results underline the complex interactions between a host and its microbiota over time. Understanding microbial assembly rules would help preserve grapevine health, understand the particularity of vintages and intensify the spirit of the wine (*microbial terroir*). More broadly, this study underlines the need for a more detailed evaluation of the temporal dynamics of the microbial communities in the general context of global warming.

### Materials and Methods

#### Experimental design and study site

We selected individual vine plants in a single 66-ha vineyard located in Margaux, France, (45°2'12.73 "N; 0°40'9.84 "O). Organic and biodynamic practices have been used in the vineyard for 12 years. We sampled 25 fields (8 individuals per field), the number of fields containing Cabernet Sauvignon CS (12 fields) and Merlot M (13 fields) cultivars was balanced (Figure 1) and the fields contained cultivars of similar age ranges (CS: from 53 to 4 and M: from 75 to 4 years after planting). We analyzed the composition of the microbial community associated with roots of the two grapevine cultivars in September 2018 (S18), June 2019 (J19), and September 2019 (S19) (June: flowering stage and September: mature grapes before harvest). The same individual grapevines were sampled in the three sampling campaigns (Figure 1). The region is characterized by a temperate climate with average temperatures of 14.2 °C (2018) and 14 °C (2019); and cumulative annual precipitation of 934mm (2018) and 1,112mm (2019). Figure S1 shows the average daily temperature and cumulative precipitation per day recorded in the three sampling campaigns, two in 2018 and one in 2019 by the DEMETER weather station located in Margaux, <http://www.meteo-agriculture.eu>.

#### Sampling and DNA extraction

On each date, 200 similar non-lignified vine root fragments (i.e. roots produced during the current year) were collected to analyze variations in the grapevine root microbiota over time. Roots of similar shape and diameter were picked close to the stem at a depth of 5-20 cm and placed in individual hermetic bags

## Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

and stored in cooled packs. At the laboratory, the roots were thoroughly washed in tap water, then immersed in a 5% Triton X100 solution for 10 minutes and finally thoroughly rinsed several times using sterile ultra-pure water. The cleaned roots were placed in sterile micro-tubes and stored at -80 °C until DNA processing. Total root DNA was extracted and quantified at the GENTYANE platform (Clermont-Ferrand, France) using magnetic bead technology (Sbeadex) on an Oktopure LGC Genomics automat with Hoechst 33258 reagent. The DNA samples were then stored at -20 °C until amplicon production.

### **Molecular biology and sequencing**

All 600 extracted DNA were normalized at 10n/μL to insure PCR amplifications were the same for all the samples. Endophytic fungi were targeted by amplifying an 18S rRNA gene fragment with fungal primers NS22b (5'-AATTAAGCAGACAAATCACT-3') and SSU817 (5'-TTAGCATGGAATAATRRAATAGGA-3'). Endophytic bacteria were analyzed by PCR amplification of a 16S rRNA gene fragment (V5-V7 region of the 16S gene) using the bacterial primers 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3') and 1223R (5'-CCATTGTAGTACGTGTGTA-3'). The sets of primers were customized to incorporate sample tags and Illumina® adaptors. To provide normalized PCR mix and avoid contamination, Illustra™PuReTaq Ready-to-go beads (GE Healthcare®) were used for both bacterial and fungal amplifications. The PCR conditions associated with the specific targets are detailed in (55). The following molecular steps were performed on the EcogenO platform (Rennes, France): briefly, PCR products were purified with AMPureXP magnetic beads (Agencourt®) and quantified with a Quant-iT PicoGreen™ dsDNA Assay Kit to insure normalization of the PCR products at the same concentration. A second PCR using the Smartchip-Real Time PCR machine (Takara) performed multiplex tagging, the resulting tagged-amplicon pool was purified (AMPureXP, Agencourt®) and quantified using the Kapa Library Quantification Kit-Illumina®. The bacterial and fungal libraries were finally sequenced on an Illumina MiSeq (PE-2x250 and PE-2x300 cycles for bacterial- and fungal-amplifications respectively, with 3 sequencing runs each).

### Raw data processing and clustering

Base calling was performed on the Miseq instrument with CASAVA v1.8 software (Illumina). Sequence data trimming consisted of removing primers and deleting reads containing unidentified bases using Cutadapt software. The sequences were then processed using the FROGS pipeline following the author's recommendations (56). The FROGS pipeline uses SWARM as a sequence agglomeration strategy to produce “sequence clusters”.

Briefly, the filtering steps recommended by the authors (56) comprised a specialized algorithm for de-noising and a chimera removal step to exclude artificial sequence clusters. Further filtering enabled removal of all sequence clusters identified in fewer than three samples and with a threshold of 0.005%

### *Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne*

of reads. After taxonomic affiliations using Silva138 16S rRNA for bacteria (57) and Phymyco-DB databases for fungi (58), a final filtering step was applied to affiliated sequence clusters (95% coverage and 95% identity (BLAST)).

The resulting contingency tables contained 14 765 700 reads for bacteria and 12 483 626 reads for fungi. Rarefaction curves were produced using R (function “rarefy” in the “vegan” package). Sequencing depths of both bacterial and fungal microbiota were sufficient to limit sequence cluster subsampling (Figure S2). To perform statistical analysis, because the slopes of the curves tended toward a plateau (Figure S2), we normalized the number of reads at 8 500 and 3 700 reads for the bacterial- and fungal- dataset respectively. Samples with less than the 8 500 and 3 700 cut off reads were removed from the dataset. None of the fields were composed of less than four out of the eight samples.

The final matrices containing 947 bacterial and 529 fungal sequence clusters were then used for statistical analyses. We calculated sequence cluster richness using the R “vegan” package. Index calculations and statistical analyses were performed for the dominant phyla (i.e., phyla representing the most sequence clusters with a threshold set at 5% of the total sequence clusters per date at the vineyard scale for the two microbial communities).

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software version 4.0.4. We analyzed the effect of the sampling date (S18, J19 and S19) on root endospheric microbiota structure with a combination of multivariate analysis, univariate models, and neutral models. We checked if the microbial communities inhabiting the two cultivars differed using RDA (Redundancy analyses; Figure S3). RDA were performed on Hellinger distances computed from sequence cluster matrices. The cultivar effect was assessed by a permutation test (999 repetitions) using the “RVAideMemoire” package. Because there was a significant effect of the cultivar in the two taxonomic groups (Figure S3), all the subsequent statistical analyses were conducted separately on each cultivar to test the effect of the sampling date.

#### *Effect of the sampling date on microbial assemblage structure*

Bacterial and fungal sequence clusters found on all three sampling dates in each cultivar are illustrated using the “VennDiagram” package in R (Figure 3). Partial principal coordinate analyses (PCoAs) were performed to assess the distribution pattern of root endospheric microbiota. PCoAs were based on Hellinger distances computed from sequence cluster matrices (59). The individual grapevine was considered as a conditional effect to account for the biological dependency of the samples. The effect of the sampling date was assessed by a permutation test applied on the first PCoA factorial plane (function envfit() in the R “vegan” package, 999 permutations). Pairwise comparisons were performed in the same way, with p-values adjusted using false discovery rate correction (60) (Figure 4). We used Wald

### *Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne*

tests applied to linear mixed models to test whether the sampling date impacted microbial richness (Figure 5). We constructed all the models using the richness index as the explanatory variable, the “individual grapevine” as random effect, and the “sampling date” as fixed effect. The linear mixed models and subsequent tests were performed using the lme4 (61), car (62), emmeans (63) packages.

#### *Sampling dates differences on stochastic and deterministic assemblage processes*

The Sloan neutral model community (NMC) was used to determine the influence of neutral processes on the bacterial and fungal community assembly inhabiting the root (64). This neutral model predicts the relationship between sequence cluster detection frequency and their relative abundance (40, 65). The model predicts that species that are more abundant in the metacommunity (total source pool) are more expected to disperse and be randomly present in different sampling conditions, whereas species with low abundance are more likely to get lost due to ecological drift (40). In this study, we conducted neutral model analyses assuming the three-date metacommunity (i.e., the total dataset of a given cultivar) was the source of microbial communities (Figure 6; Figure S4). One neutral model was generated per sampling date and per taxonomic group (fungi and bacteria). The adequacy of model fitting was assessed through  $R^2$  values ( $0 < R^2 \leq 1$ ) (64). The sequence clusters from each matrix were then separated into three classes depending on their occurrence frequency based on a 95% confidence interval of the neutral community model predictions. The 95% confidence intervals around all fitting statistics were obtained by bootstrapping with 1 000 replicates. The three categories corresponded to the sequence clusters that were more frequent than expected (above class), less frequent than expected (below class), and within the confidence interval (neutral class). The model also calculated the estimate rate “m” (read as a measure of dispersal limitation) using a non-linear least squares fitting (NLS-“minpack.lm” package (66). The m value gives the probability of dispersal substitution from the metacommunity due to random loss of species in the local community (40). Therefore, higher m values likely show less dispersal limitation. The R code used for this analysis originated from (40). We further analyzed the sequence clusters specific to each class (above, below, and neutral classes) and extracted their taxonomic affiliations to identify the main specific taxonomic patterns that define each class associated with each sampling date.

#### **Data availability**

Data are available on Figshare <https://figshare.com/s/6c6ca1fee254f88e0598> (private link until paper acceptance)

Sequence data are available at European Nucleotide Archive (ENA) under accession number PRJEB47615

## References

1. Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. 2015. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* 206:1196–1206.
2. Lemanceau P, Blouin M, Muller D, Moëgne-Loccoz Y. 2017. Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends Plant Sci* 22:583–595.
3. Compant S, Samad A, Faist H, Sessitsch A. 2019. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res* 19:29–37.
4. Müller DB, Vogel C, Bai Y, Vorholt JA. 2016. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu Rev Genet* 50:211–234.
5. Smith SE, Read DJ. 2009. *Mycorrhizal symbiosis* 3. ed., Repr. Elsevier/Acad. Press, Amsterdam.
6. Yang T, Chen Y, Wang X-X, Dai C-C. 2013. Plant symbionts: keys to the phytosphere. *Symbiosis* 59:1–14.
7. Vannier N, Mony C, Bittebière A-K, Vandenkoornhuysen P. 2015. Epigenetic Mechanisms and Microbiota as a Toolbox for Plant Phenotypic Adjustment to Environment. *Front Plant Sci* 6.
8. Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa T, Singh BK. 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol* 18:607–621.
9. Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton-Marcell J, Lax S, Bokulich NA, Mills DA, Martin G, Taghavi S, van der Lelie D, Gilbert JA. 2015. The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *mBio* 6:e02527-14.
10. Pacifico D, Squartini A, Crucitti D, Barizza E, Lo Schiavo F, Muresu R, Carimi F, Zottini M. 2019. The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers. *Front Plant Sci* 10:1256.
11. Morrison-Whittle P, Goddard MR. 2015. Quantifying the relative roles of selective and neutral processes in defining eukaryotic microbial communities. *ISME J* 9:2003–2011.
12. Xiong C, Zhu Y, Wang J, Singh B, Han L, Shen J, Li P, Wang G, Wu C, Ge A, Zhang L, He J. 2021. Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity. *New Phytol* 229:1091–1104.
13. Werner GDA, Kiers ET. 2015. Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytol* 205:1515–1524.
14. Berlanas C, Berbegal M, Elena G, Laidani M, Cibriain JF, Sagües A, Gramaje D. 2019. The Fungal and Bacterial Rhizosphere Microbiome Associated With Grapevine Rootstock Genotypes in Mature and Young Vineyards. *Front Microbiol* 10:1142.
15. Liu D, Howell K. 2020. Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environ Microbiol* 1462-2920.15172.
16. Mougél C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, Robin C, Lemanceau P. 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytol* 170:165–175.
17. Jumpponen A, Jones KL. 2010. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytol* 186:496–513.
18. Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J* 8:790–803.
19. Copeland JK, Yuan L, Layeghifard M, Wang PW, Guttman DS. 2015. Seasonal Community Succession of the Phyllosphere Microbiome. *Mol Plant-Microbe Interactions*® 28:274–285.
20. Grady KL, Sorensen JW, Stopnisek N, Guittar J, Shade A. 2019. Assembly and seasonality of core phyllosphere microbiota on perennial biofuel crops. *Nat Commun* 10:4135.

21. Chesneau G, Torres-Cortes G, Briand M, Darrasse A, Preveaux A, Marais C, Jacques M-A, Shade A, Barret M. 2020. Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiol Ecol* 96:fiaa190.
22. Berg G, Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: Plant species, soil type and rhizosphere communities. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1–13.
23. Vandenkoornhuysen P, Husband R, Daniell TJ, Watson IJ, Duck JM, Fitter AH, Young JPW. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol Ecol* 11:1555–1564.
24. Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuysen P, Jansa J, Bucking H. 2011. Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science* 333:880–882.
25. Pérez-Jaramillo JE, Carrión VJ, Bosse M, Ferrão LFV, de Hollander M, Garcia AAF, Ramírez CA, Mendes R, Raaijmakers JM. 2017. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *ISME J* 11:2244–2257.
26. Saleem M, Law AD, Sahib MR, Pervaiz ZH, Zhang Q. 2018. Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome. *Rhizosphere* 6:47–51.
27. Iannucci A, Canfora L, Nigro F, De Vita P, Beleggia R. 2021. Relationships between root morphology, root exudate compounds and rhizosphere microbial community in durum wheat. *Appl Soil Ecol* 158:103781.
28. Liu D, Zhang P, Chen D, Howell K. 2019. From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Front Microbiol* 10:2679.
29. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu Rev Plant Biol* 64:807–838.
30. Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Rep* 39:3–17.
31. Govindasamy V, Franco CMM, Gupta VVSR. 2014. Endophytic Actinobacteria: Diversity and Ecology, p. 27–59. *In* Verma, VC, Gange, AC (eds.), *Advances in Endophytic Research*. Springer India, New Delhi.
32. Doumbou CL, Hamby Salove MK, Crawford DL, Beaulieu C. 2005. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82:85–102.
33. Schrey SD, Tarkka MT. 2008. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:11–19.
34. Lidbury IDEA, Borsetto C, Murphy ARJ, Bottrill A, Jones AME, Bending GD, Hammond JP, Chen Y, Wellington EMH, Scanlan DJ. 2021. Niche-adaptation in plant-associated Bacteroidetes favours specialisation in organic phosphorus mineralisation. *ISME J* 15:1040–1055.
35. Bennett AE, Daniell TJ, Öpik M, Davison J, Moora M, Zobel M, Selosse M-A, Evans D. 2013. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Networks Vary throughout the Growing Season and between Successional Stages. *PLoS ONE* 8:e83241.
36. Porrás-Alfaro A, Bayman P. 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 49:291–315.
37. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:293–320.
38. Saikkonen K, Ion D, Gyllenberg M. 2002. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 269:1397–1403.

39. Andreo-Jimenez B, Vandenkoornhuysen P, Lê Van A, Heutinck A, Duhamel M, Kadam N, Jagadish K, Ruyter-Spira C, Bouwmeester H. 2019. Plant host and drought shape the root associated fungal microbiota in rice. *PeerJ* 7:e7463.
40. Burns AR, Stephens WZ, Stagaman K, Wong S, Rawls JF, Guillemin K, Bohannan BJ. 2016. Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in the zebrafish over host development. *ISME J* 10:655–664.
41. Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM. 2008. Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. *Appl Environ Microbiol* 74:738–744.
42. Chaparro JM, Badri DV, Bakker MG, Sugiyama A, Manter DK, Vivanco JM. 2013. Root Exudation of Phytochemicals in *Arabidopsis* Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. *PLoS ONE* 8:e55731.
43. Jacoby RP, Koprivova A, Kopriva S. 2021. Pinpointing secondary metabolites that shape the composition and function of the plant microbiome. *J Exp Bot* 72:57–69.
44. Zhalnina K, Louie KB, Hao Z, Mansoori N, da Rocha UN, Shi S, Cho H, Karaoz U, Loqué D, Bowen BP, Firestone MK, Northen TR, Brodie EL. 2018. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nat Microbiol* 3:470–480.
45. Voges MJEEE, Bai Y, Schulze-Lefert P, Sattely ES. 2019. Plant-derived coumarins shape the composition of an *Arabidopsis* synthetic root microbiome. *Proc Natl Acad Sci* 116:12558–12565.
46. Cotton TEA, Pétriacq P, Cameron DD, Meselmani MA, Schwarzenbacher R, Rolfe SA, Ton J. 2019. Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *ISME J* 13:1647–1658.
47. Jacoby RP, Chen L, Schwier M, Koprivova A, Kopriva S. 2020. Recent advances in the role of plant metabolites in shaping the root microbiome. *F1000Research* 9:151.
48. Dang H, Zhang T, Wang Z, Li G, Zhao W, Lv X, Zhuang L. 2021. Succession of endophytic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi associated with the growth of plant and their correlation with secondary metabolites in the roots of plants. *BMC Plant Biol* 21:165.
49. Kaur S, Suseela V. 2020. Unraveling Arbuscular Mycorrhiza-Induced Changes in Plant Primary and Secondary Metabolome. *Metabolites* 10:335.
50. Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF. 2003. Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism. *Nature* 425:78–81.
51. Xiong C, Singh BK, He J-Z, Han Y-L, Li P-P, Wan L-H, Meng G-Z, Liu S-Y, Wang J-T, Wu C-F, Ge A-H, Zhang L-M. 2021. Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome. *Microbiome* 9:171.
52. Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA. 2014. PNAS Plus: From the Cover: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci* 111:E139–E148.
53. Marasco R, Rolli E, Fusi M, Michoud G, Daffonchio D. 2018. Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome* 6:3.
54. Zhang J, Wang ET, Singh RP, Guo C, Shang Y, Chen J, Liu C. 2019. Grape berry surface bacterial microbiome: impact from the varieties and clones in the same vineyard from central China. *J Appl Microbiol* 126:204–214.
55. Vannier N, Mony C, Bittebiere A-K, Michon-Coudouel S, Biget M, Vandenkoornhuysen P. 2018. A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome* 6:79.
56. Escudíé F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294.

57. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596.
58. Mahé S, Duhamel M, Le Calvez T, Guillot L, Sarbu L, Bretaudeau A, Collin O, Dufresne A, Kiers ET, Vandenkoornhuysen P. 2012. PHYMYCO-DB: A Curated Database for Analyses of Fungal Diversity and Evolution. *PLoS ONE* 7:e43117.
59. Legendre P, Gallagher ED. 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129:271–280.
60. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289–300.
61. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw* 67.
62. Fox J, Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA 2019 <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
63. Searle S R, Speed F M & Milliken GA. 1980, 2021. Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means, *The American Statistician*, 34:4, 216-221
64. Sloan WT, Lunn M, Woodcock S, Head IM, Nee S, Curtis TP. 2006. Quantifying the roles of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. *Environ Microbiol* 8:732–740.
65. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, Schmidt TM. 2015. Application of a Neutral Community Model To Assess Structuring of the Human Lung Microbiome. *mBio* 6.
66. Elzhov TV, Mullen KM, Spiess AN, Bolker B. minpack.lm: R interface to the Levenberg-Marquardt nonlinear least-squares algorithm found in MINPACK, plus support for bounds. <http://CRAN.R-project.org/package=minpack.lm> R package version. 2013:11–7.



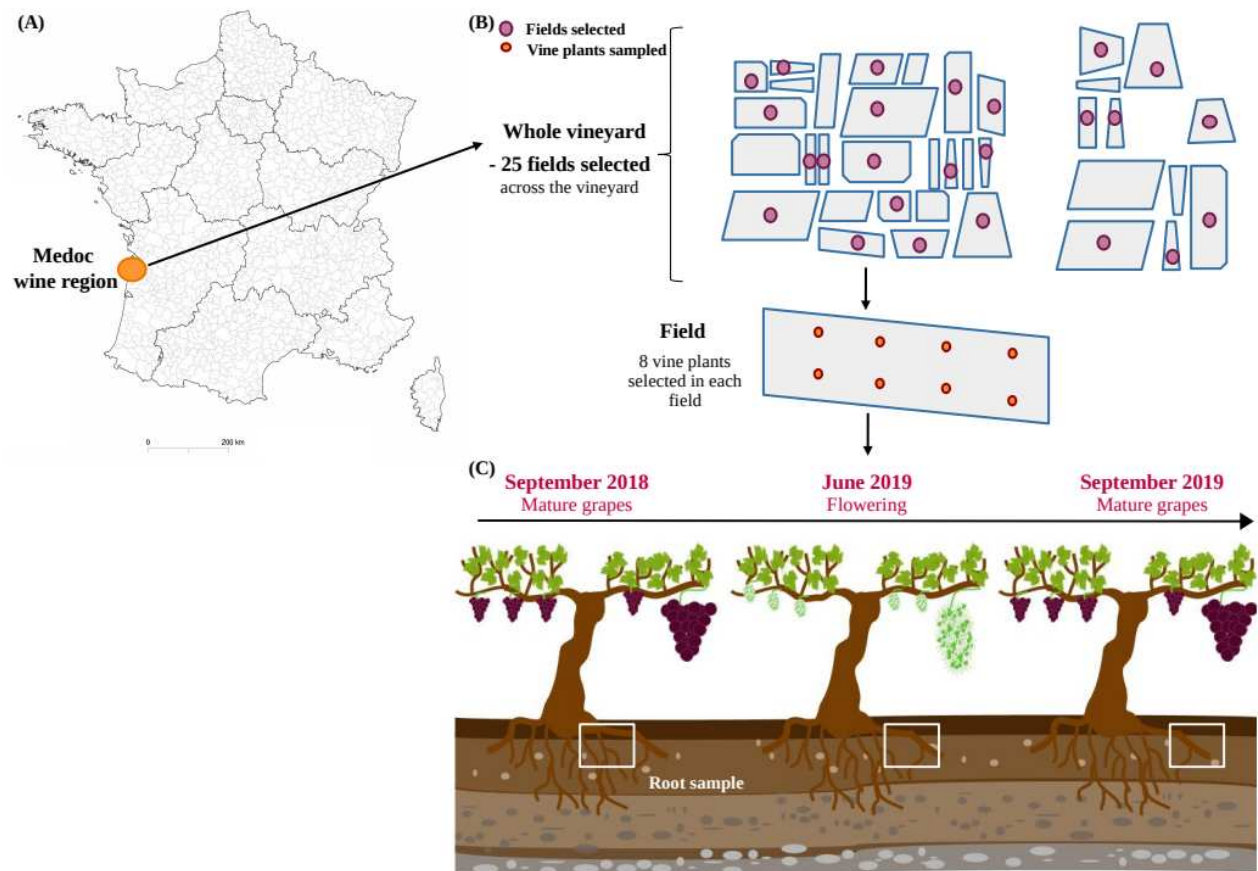
## **Acknowledgements**

This work was supported by the "Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie" (ANRT) through an industrial CIFRE agreement between Château Palmer, Château Latour, Sovivins, Pépinière de Salettes and the University of Rennes 1 (Agreement N° 2017/1579). We are grateful to the GENTYANE and, within the ANAEE-France research infrastructure, to the EcogenO platforms for help with DNA extraction and amplicon sequencing, respectively. We are also grateful to the Genotoul platform Toulouse Midi-Pyrenees for access to their bioinformatics pipeline and storage facilities and the Ecolex platform for help during sampling. We deeply acknowledge all the trainees and people at Château Palmer for their help during the sampling campaigns, especially Sylvain Fries, Oriane Heulliet, Hélène Sarkis for their help performing this work. We are also grateful to July Hémon (EcogenO, molecular analysis), Achim Quaiser and Ning Ling (sampling) and Tingting Wang (statistical advice and help with neutral model processing).

## **Author contribution**

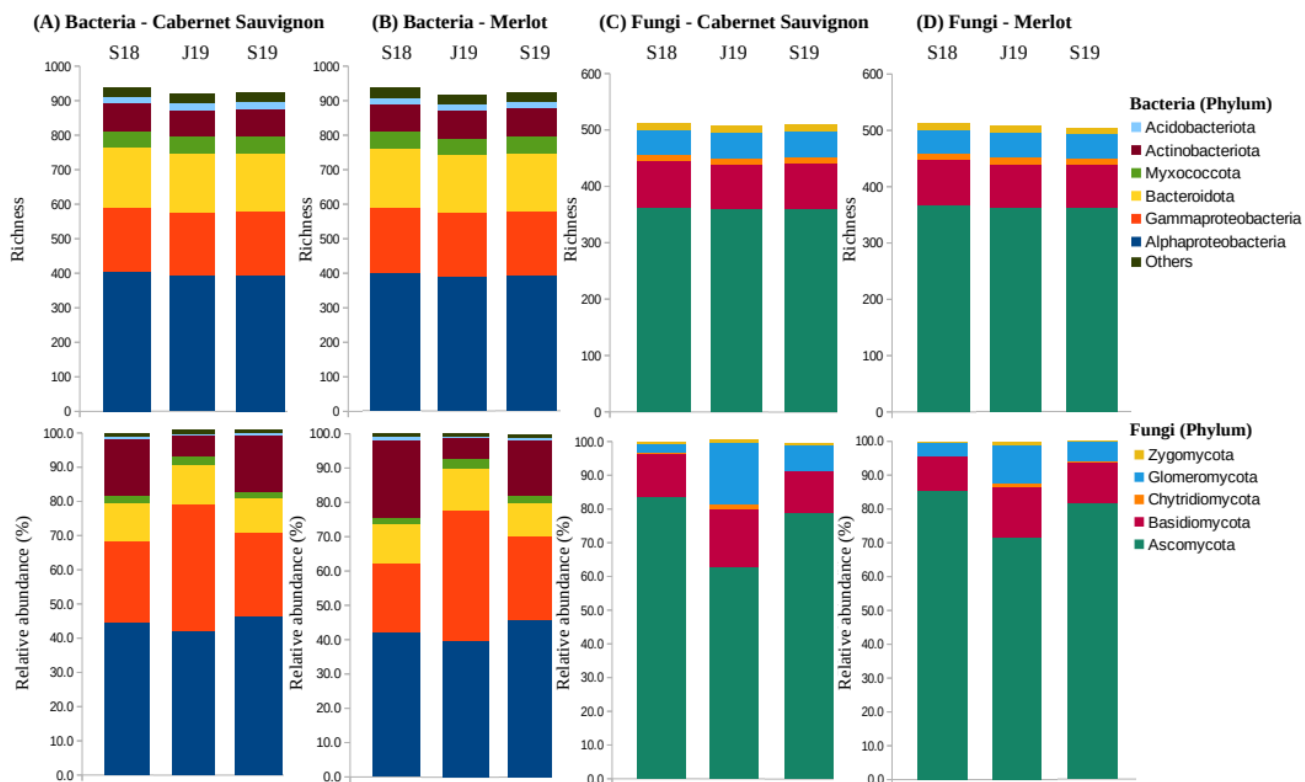
MB, CM, SP, VC and PV conceived the project. PV, CM and MB set up the methodology of the study. MB, CM, OJ and PV conducted the sampling. MB conducted lab experiments with the help of AM. RCV and SMC performed the sequencing and MB analyzed the sequence data. MB performed the statistical analyses with advice from CM and MH. MB wrote the first draft of the paper. All the authors gave their final approval for publication.

Figures



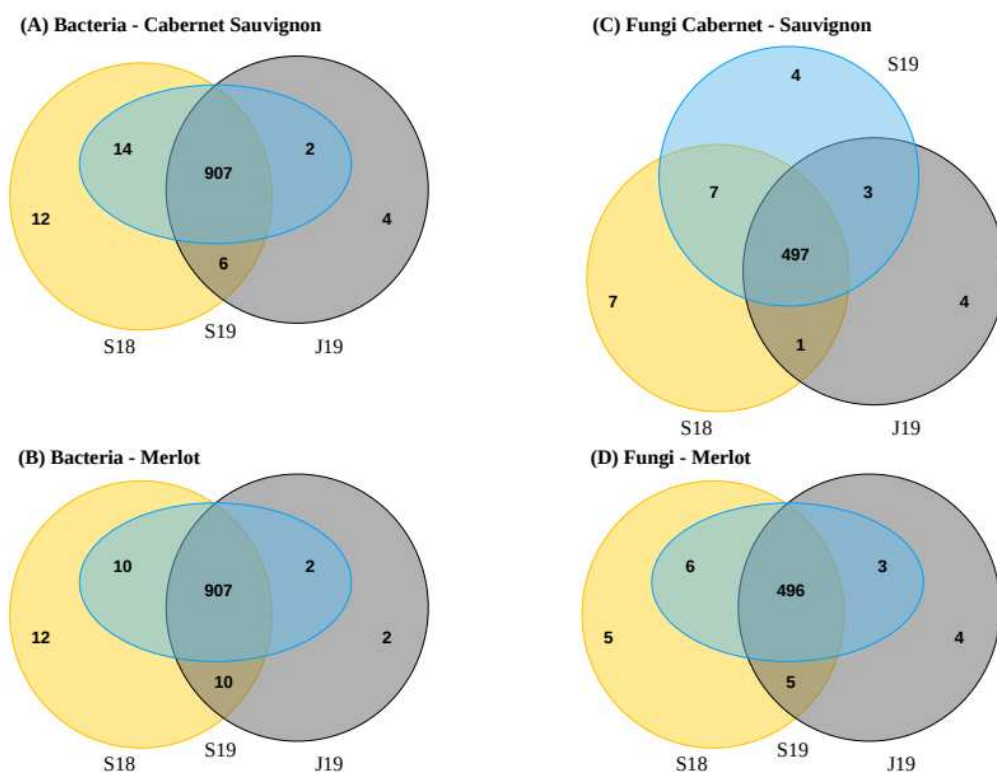
**Fig. 1 Experimental design and sampling scheme.**

(A) Map of the study site near Bordeaux (France) in the Medoc wine region. (B) Scheme representing the location of the 25 fields across the vineyard and the 8 equidistant grapevines sampled in each field. (C) Sampling dates of root collection associated with the plant developmental stage: September 2018 and 2019 (S18/S19 - mature grapes) and June 2019 (J19 - flowering period).



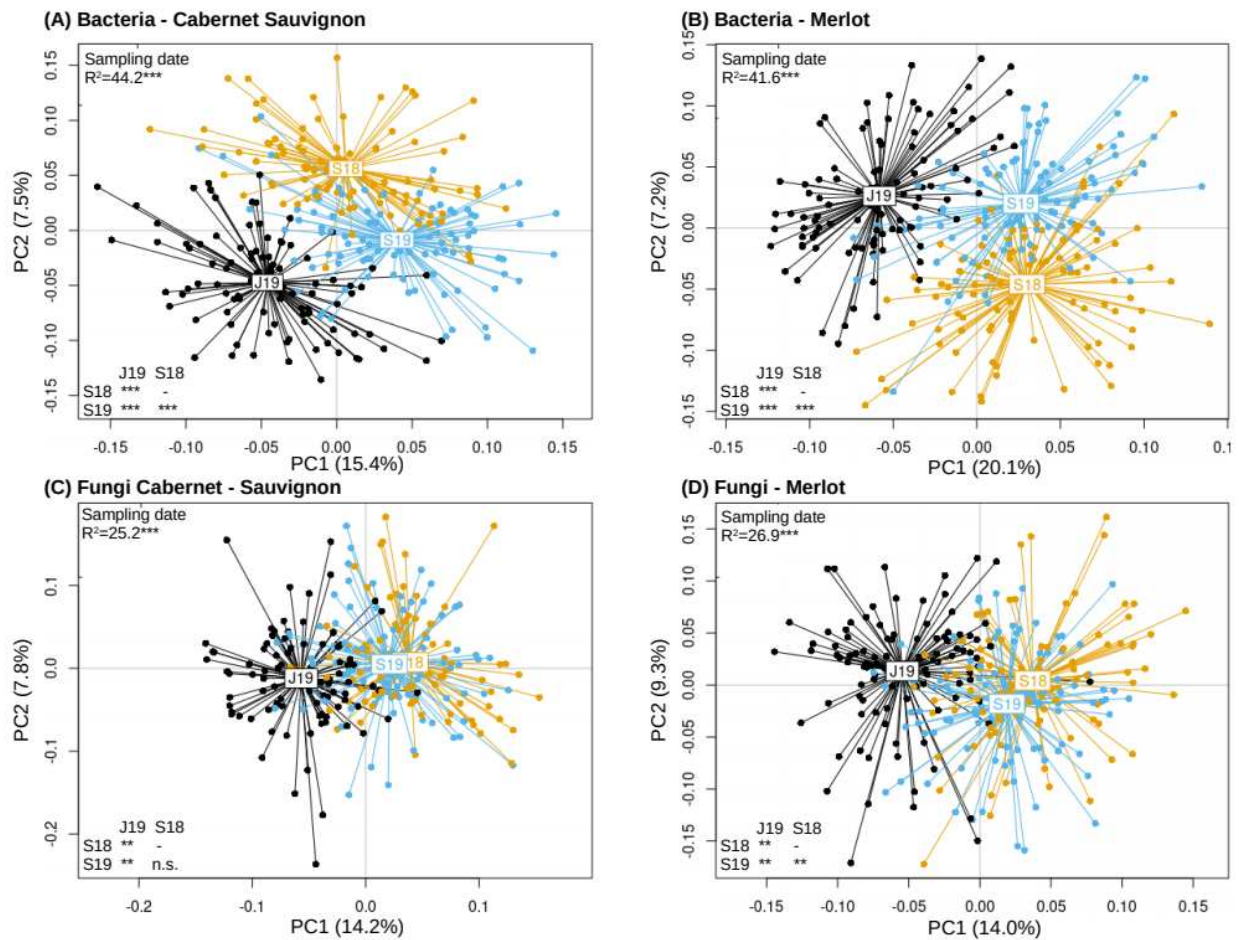
**Fig. 2 Description of the microbial communities at the vineyard scale for each sampling date**

Sequence cluster richness and relative abundance (%) of the root endospheric bacterial (A, B) and fungal (C, D) microbiota of the grapevine at the phylum level of the two cultivars considered: Cabernet Sauvignon (A, C) and Merlot (B, D). Each community is described for each sampling date (S18: September 2018; J19: June 2019 and S19: September 2019). \* The bacterial group “others” contained phyla with 10 or fewer sequence clusters: Bdellovibrionota, Dependientiae, Desulfobacterota, Fibrobacterota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Spirochaetota, Verrucomicrobiota.



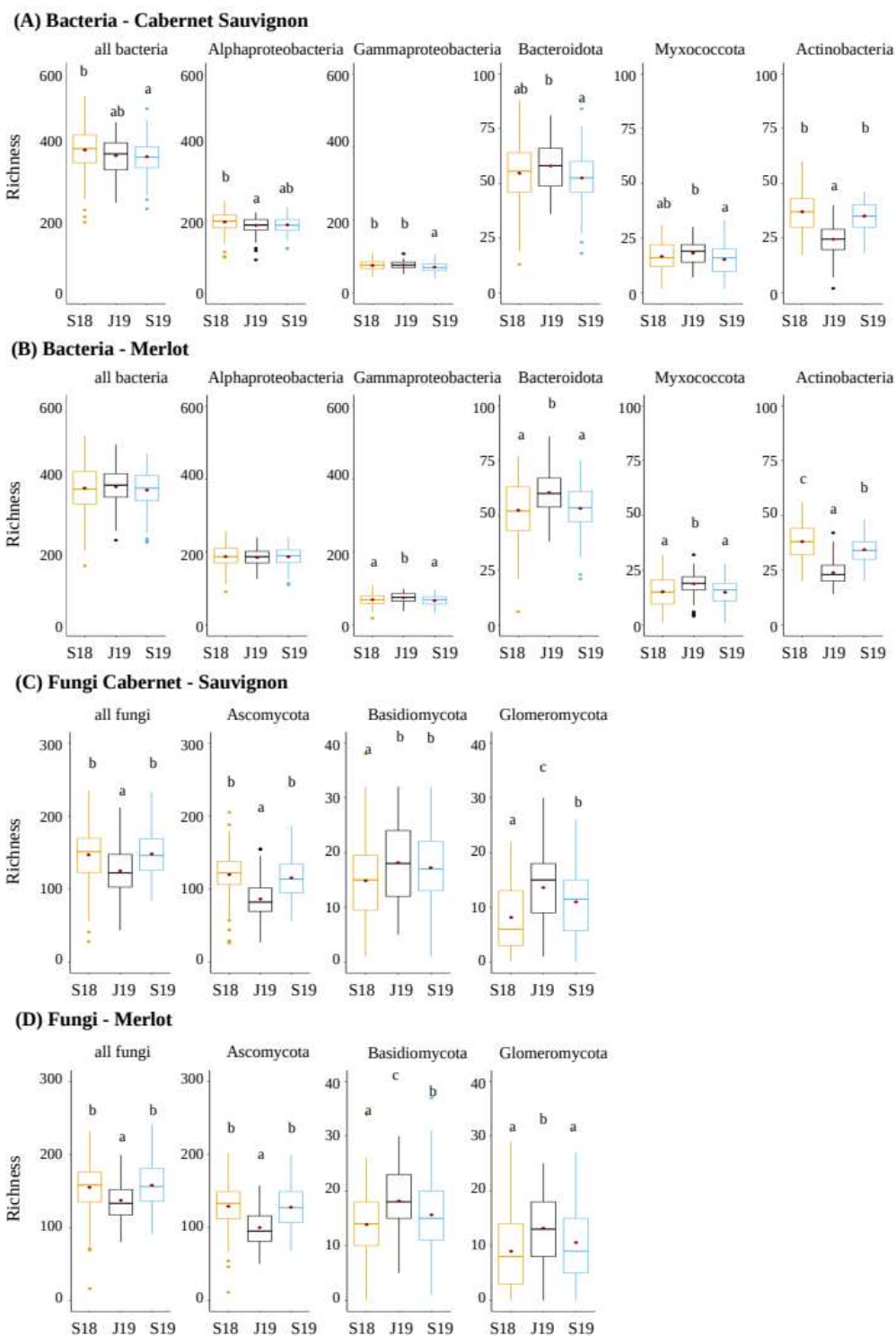
**Fig. 3 Venn diagrams depicting unique and shared sequences clusters of bacteria and fungi among the different sampling dates.**

(A), (B) Venn diagrams of bacterial sequence clusters in the root endosphere of Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars respectively. (C), (D) Venn diagrams of fungal sequence clusters in the root endosphere of Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars respectively. The Venn diagrams show unique sequence clusters among different sampling dates (S18-yellow: September 2018; J19-black: June 2019 and S19-blue: September 2019) and between two sampling dates (S18/J19; S18/S19 and J19/S19).



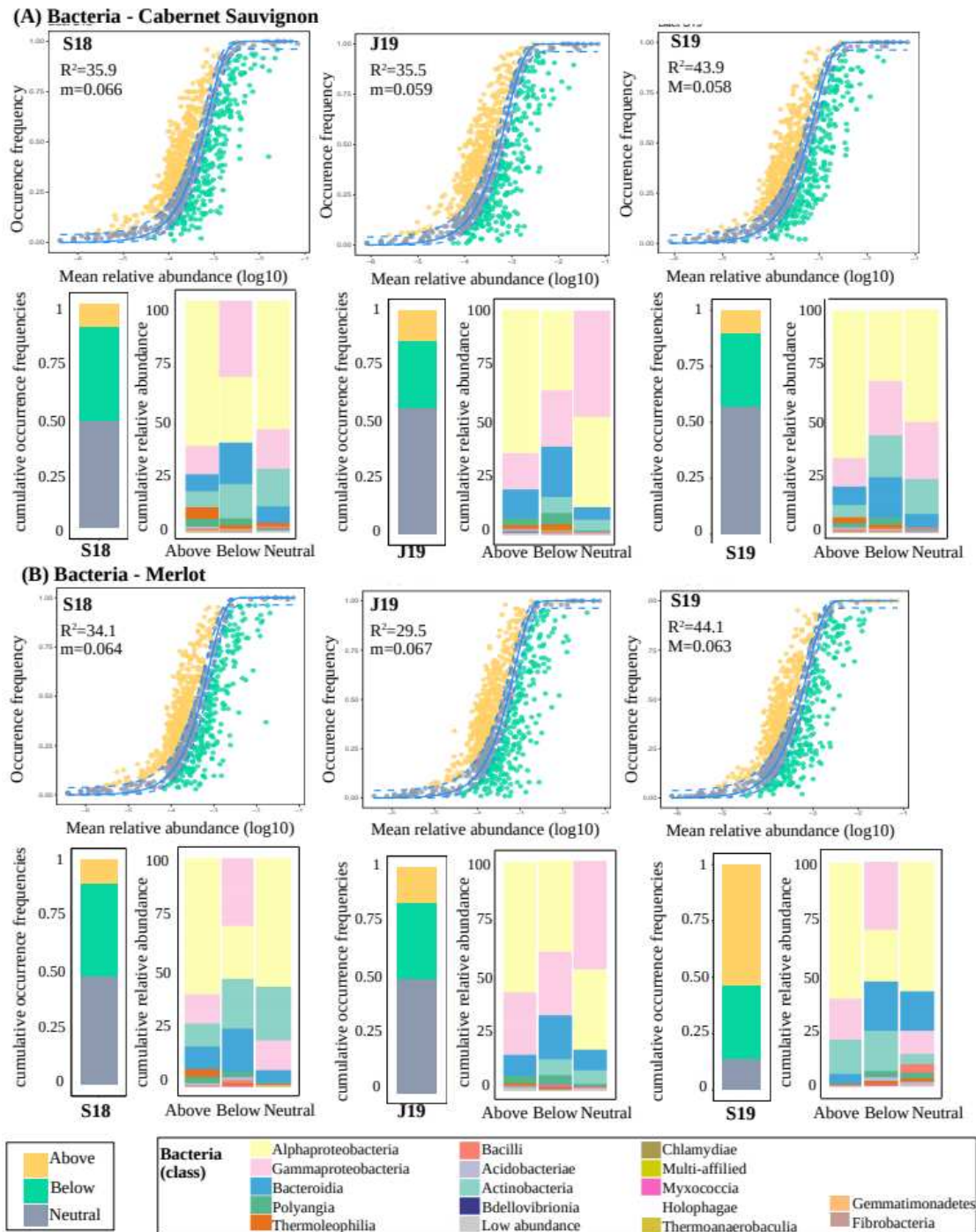
**Fig. 4 Principal coordinate analysis (PCoA) plots showing the Hellinger distance of the microbial communities.**

Analyses were done on the sequence cluster matrix of the bacterial (A, B) and fungal (C, D) communities in the two cultivars: Cabernet Sauvignon (A, C) and Merlot (B, D). Results of the permutation tests used to test the effect of the sampling dates (\*\*\*:  $p < 0.001$ ) and  $R^2$ , percentage of variance explained, are included in the plots. Statistical results of the pairwise comparisons are also shown in the plots (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; n.s:  $p > 0.05$ ). S18-yellow: September 2018; J19-black: June 2019 and S19-blue: September 2019.



**Fig. 5 Effect of the sampling date on bacterial and fungal sequence cluster richness at the  $\alpha$ -diversity scale.**

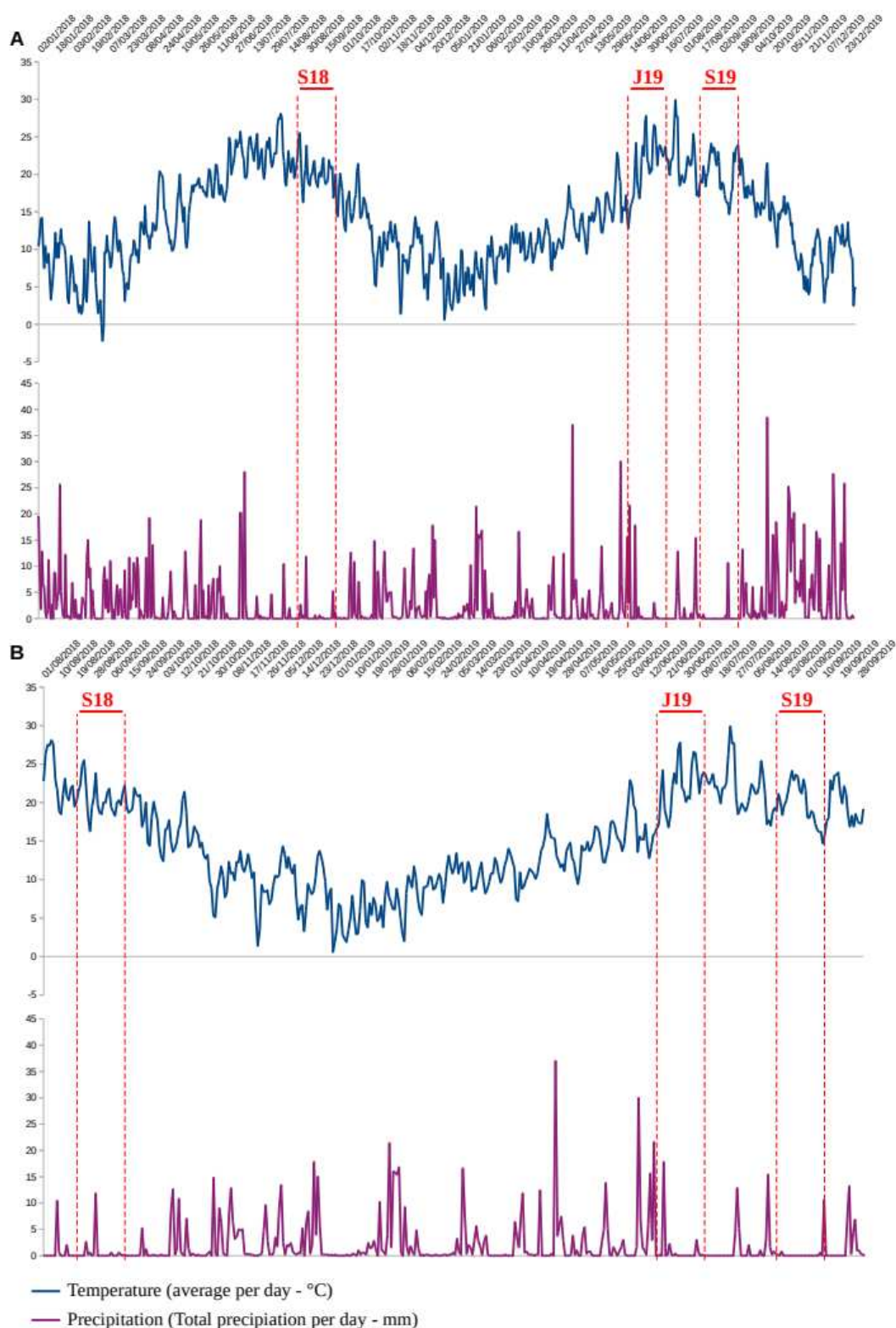
Linear mixed models for each sampling campaign were used to test whether the sampling date impacted microbial richness (with individual grapevine as random effect). (A), (B) Results of bacterial communities on Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars respectively. (C), (D) Results of fungal communities on Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars respectively. S18-yellow: September 2018; J19-black: June 2019 and S19-blue: September 2019. The red diamond represents the average value of richness per sampling date. Y scales are adjusted depending on the projected values.



**Fig. 6 Partition of deterministic and stochastic processes of bacterial community assembly (neutral community model (NCM)).**

(A) S18/J19/S19-Cabernet Sauvignon and (B) S18/J19/S19-Merlot, were used as the community source to create neutral models. The first graphs show the occurrence frequencies predicted by the NCM. Sequence clusters that occurred more frequently than expected are represented by yellow dots and those that occurred less frequently by green dots. The solid blue line indicates the best fit of the model and the dashed lines show the 95% confidence intervals. The dashed lines indicate the neutrality envelope. “m” (estimate rate) and R<sup>2</sup> (0 < R<sup>2</sup> ≤ 1, adequacy of the model fitting) are indicated on the graphs. The single bar charts indicate cumulative sequence cluster occurrence frequencies of above, neutral and below partitions; the combined bar charts show the ranked cumulative relative abundance of taxonomic groups of the three sequence clusters.

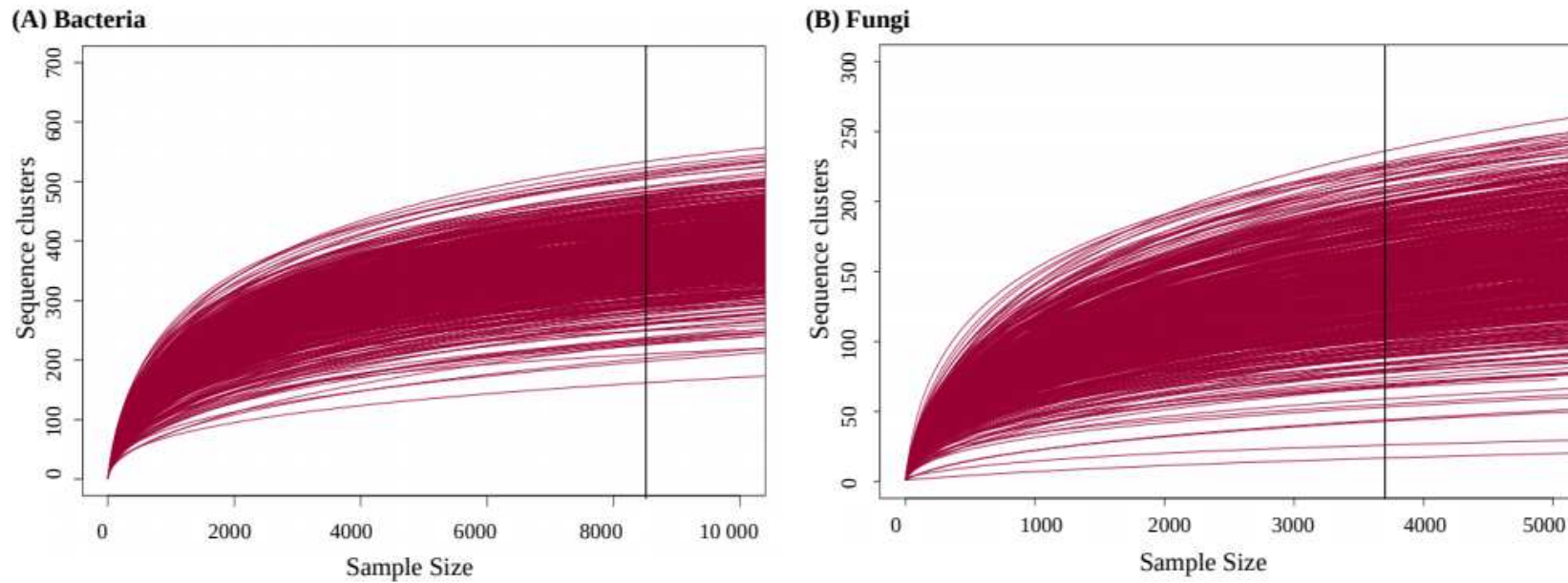
Supplementary data



**Fig. S1** Graphs showing annual temperature and total precipitation per day in 2018 and 2019

Curves showing average temperatures per day (blue lines, °C) and total precipitation per day (purple lines, mm of rain) in the two years analyzed, 2018 and 2019 (A) and during the sampling period, i.e. from September 2018 to September 2019 (B). The red dashed lines indicate the three sampling periods of interest (S18, J19 and S19).





**Fig. S2 Rarefaction curves for (A) “all bacteria” samples and (B) “all fungi” samples.**

Curves show the total assigned sequence clusters detected relative to sample size in sequence number. The vertical line corresponds to the number of sequence clusters in which data were rarefied.

**Table S1. Detailed description of the community.**

Sequence cluster richness and relative abundance (%) of the root endospheric bacterial (A) and fungal (B) microbiota of the grapevine at the phylum level. Details are given for the two cultivars (Cabernet Sauvignon and Merlot) analyzed on each sampling date (S18: September 2018; J19: June 2019 and S19: September 2019). \* The “others” group contains phyla with 10 or fewer sequence clusters: Bdellovibrionota, Dependientiae, Desulfobacterota, Fibrobacterota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Spirochaetota, Verrucomicrobiota.

(A) Bacteria	Carbernet Sauvignon						Merlot					
	S18		J19		S19		S18		J19		S19	
	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence
Alpha-proteobacteria	403	44.6	394	41.6	394	46.1	401	42.3	392	39.6	392	47.9
Gamma-proteobacteria	189	23.8	183	36.7	186	24.1	188	20.2	185	37.9	182	21.4
Bacteroidota	172	11.3	171	11.6	168	10.0	174	11.2	171	12.4	170	11.6
Myxococcota	47	2.3	47	2.7	47	1.9	47	1.9	47	2.9	47	1.7
Actinobacteria	82	16.3	78	5.7	82	16.4	82	22.7	80	6.0	82	15.5
Acidobacteria	18	0.8	18	0.5	18	0.6	18	1.0	18	0.6	18	1.0
Others *	28	1.0	28	1.1	28	1.0	29	0.8	28	0.8	28	0.9

Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

(B) Fungi	Carbernet Sauvignon						Merlot					
	S18		J19		S19		S18		J19		S19	
	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence	Sequence cluster	% of sequence
Ascomycota	363	83.7	359	62.4	363	79.4	368	85.3	363	71.6	363	81.6
Basidiomycota	81	12.6	77	17.4	80	12.3	81	10.2	78	15.3	78	12.1
Glomeromycota	44	2.8	45	18.2	45	7.7	40	4.1	43	11.5	42	5.7
Chytridiomycota	13	0.4	12	1.1	12	0.2	11	0.1	12	0.8	11	0.2
Zygomycota	11	0.5	12	0.9	11	0.4	12	0.2	12	0.9	11	0.3

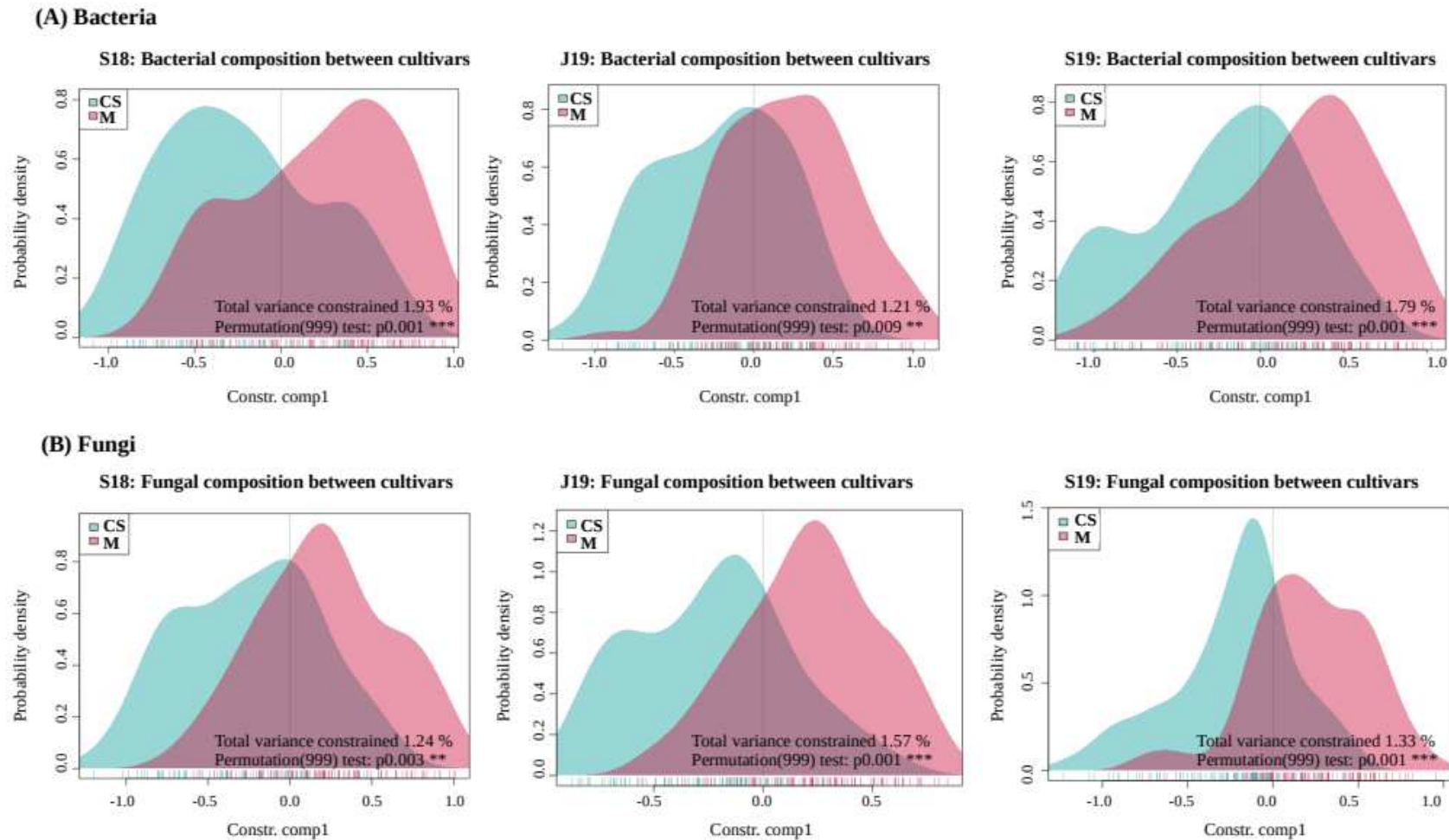
**Table S2. Summary of the sequence cluster richness index for (A) the bacterial and (B) the fungal communities.**

The values were calculated for the entire “all bacteria” / “all fungi” communities and associated phyla. Only the most abundant phyla in the two microbial communities were kept for analysis (Acidobacteria and “others”\* phyla were removed from bacteria, and Chytridiomycota and Zygomycota were removed from fungi). Mean, standard deviation (SD), and the range of the values (minimum-maximum) are shown for each cultivar (Cabernet Sauvignon and Merlot) and each sampling date (S18: September 2018; J19: June 2019; S19: September 2019). \*“others” represents very rare taxa i.e., found in less than 10 sequence clusters: Bdellovibrionota, Dependientia, Desulfobacterota, Fibrobacterota, Firmicutes, Gemmatimonadota, Spirochaetota, Verrucomicrobiota.

(A) Bacteria	Cabernet Sauvignon						Merlot					
	S18		J19		S19		S18		J19		S19	
Richness	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range
All bacteria	391.3 (63.9)	193-539	375.7 (48.1)	247-467	372.4 (51.0)	230-504	374.6 (66.4)	162-518	378.1 (49.8)	232-494	369.4 (54.8)	226-469
Proteobacteria	269.1 (42.1)	143-355	260.6 (30.5)	174-321	256.0 (32.4)	162-329	256.4 (44.6)	109-358	259.9 (33.8)	165-331	253.4 (38.3)	149-323
Alpha-proteobacteria	193.8 (29.5)	97-252	184.6 (25.3)	90-236	186.0 (22.4)	121-234	187.3 (30.7)	91-256	185.0 (24.6)	126-239	186.5 (26.4)	110-240
Gamma-proteobacteria	75.3 (14.9)	43-109	76.0 (10.4)	51-107	70.0 (13.9)	40-106	69.2 (16.2)	18-107	74.9 (12.5)	38-99	66.9 (13.9)	32-97
Bacteroidota	54.5 (13.0)	13-88	58.0 (10.6)	36-81	52.4 (11.5)	18-84	52.3 (13.5)	6-77	60.3 (9.7)	38-86	53.2 (10.4)	21-75
Myxococcota	16.6 (7.1)	2-31	18.2 (5.0)	7-30	15.3 (6.4)	2-33	15.1 (7.2)	1-32	18.8 (5.4)	4-32	14.9 (6.5)	1-28
Actinobacteria	37.0 (8.8)	17-60	24.5 (7.2)	2-40	35.1 (6.4)	18-46	38.1 (8.4)	20-56	23.9 (5.5)	14-42	34.4 (5.9)	20-48

Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

(B) Fungi	Cabernet Sauvignon						Merlot					
	S18		J19		S19		S18		J19		S19	
Richness	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range
All fungi	146.8 (39.6)	28-235	124.7 (35.0)	44-211	148.1 (31.1)	84-233	154.8 (37.5)	16-232	136.8 (28.5)	80-199	157.8 (30.4)	91-240
Ascomycota	119.8 (33.7)	26-205	86.1 (27.8)	27-155	115.1 (27.5)	56-186	128.8 (32.4)	11-202	99.5 (25.1)	50-157	127.4 (28.3)	68-68
Basidiomycota	14.9 (7.7)	1-38	18.2 (7.0)	5-32	17.2 (6.6)	1-32	13.9 (6.1)	0-34	18.1 (5.4)	5-30	15.6 (6.6)	1-37
Glomeromycota	8.2 (5.9)	0-22	13.6 (6.2)	1-30	11.0 (6.2)	0-26	9.0 (6.9)	0-29	13.2 (6.3)	0-25	10.6 (6.6)	0-27



**Fig. S3. Redundancy analyses (RDA) plots based on the Hellinger distance of the microbial communities.**

Results of RDA analyses testing the significance of the effect of the cultivar (CS Cabernet Sauvignon and M Merlot) on the composition of the root bacterial (A) and fungal (B) communities on the three sampling dates. Results of the permutation tests testing the effect of the cultivar (\*\*\*:  $p < 0.001$ ) and the percentage of variance explained are included in the plots. Cabernet Sauvignon cultivars are shown in blue and Merlot in pink.

**Table S3. Details of the specific taxa detected (Venn diagrams).**

The tables show unique sequence clusters on a given sampling date (S18: September 2018; J19: June 2019 and S19: September 2019) and between two sampling dates (S18/J19; S18/S19 and J19/S19). The taxonomic affiliations shown in the table are limited to the genus level. Colored names of “Cluster” indicate that the cluster is specific to one sampling date and shared between the two cultivars (Cabernet Sauvignon and Merlot) (red: bacteria specific to S18; blue: bacteria specific to J19; green: bacteria specific to S19; orange: fungi specific to S18).

Bacteria	Specific sequence clusters
Cabernet Sauvignon	
S18	<b>Cluster_63</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Burkholderiales,Comamonadaceae,Ideonella
	Cluster_77 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Sphingomonadales,Sphingomonadaceae,Novosphingobium
	<b>Cluster_208</b> Dependuntiae,Babeliae,Babeliales,Vermiphilaceae,unknown genus
	Cluster_295 Proteobacteria,Alphaproteobacteria Rhizobiales ,Rhizobiaceae,Mesorhizobium
	Cluster_310 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Sphingomonadales,Sphingomonadaceae,Sphingopyxis
	Cluster_333 Bacteroidota,Bacteroidia,Chitinophagales,Chitinophagaceae,Ferruginibacter
	<b>Cluster_351</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Hyphomonadaceae,Hirschia
	Cluster_373 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Rhizobiales Incertae Sedis,Phreatobacter
	<b>Cluster_446</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Brevundimonas
	<b>Cluster_469</b> Bacteroidota,Bacteroidia,Sphingobacteriales,Sphingobacteriaceae,Pedobacter
	<b>Cluster_631</b> Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	Cluster_712 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Burkholderiales,Comamonadaceae,Methylbium
	Cluster_422 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium

Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

<b>J19</b>	Cluster_693 Bacteroidota,Bacteroidia,Sphingobacteriales,Sphingobacteriaceae,Pedobacter
	Cluster_729 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	<b>Cluster_919</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Burkholderiales,Comamonadaceae,Multi-affiliation
<b>S19</b>	none
<b>S18/J19</b>	Cluster_148 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	Cluster_247 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Caulobacter
	Cluster_301 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	<b>Cluster_437</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Legionellales,Legionellaceae,Legionella
	Cluster_508 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Phenyllobacterium
	<b>Cluster_812</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Brevundimonas
<b>S18/S19</b>	Cluster_261 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Rhizobiaceae,Aminobacter
	Cluster_342 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Enterobacteriaceae,Escherichia-Shigella
	<b>Cluster_375</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Brevundimonas
	<b>Cluster_414</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Pectobacteriaceae,Pectobacterium
	Cluster_486 Actinobacteriota,Actinobacteria,Streptomycetales,Streptomyetaceae,Streptomyces
	Cluster_533 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Enterobacteriaceae,Escherichia-Shigella
	<b>Cluster_574</b> Actinobacteriota,Actinobacteria,Streptomycetales,Streptomyetaceae,Streptomyces
	Cluster_590 Actinobacteriota,Actinobacteria,Streptomycetales,Streptomyetaceae,Streptomyces
	<b>Cluster_608</b> Bacteroidota,Bacteroidia,Sphingobacteriales,Sphingobacteriaceae,Sphingobacterium



Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

	Cluster_627 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rickettsiales,SM2D12,unknown genus
	Cluster_673 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Enterobacteriaceae,Kosakonia
	<b>Cluster_677</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Enterobacteriaceae,Kosakonia
	Cluster_682 Bacteroidota,Bacteroidia,Chitinophagales,Chitinophagaceae,Pseudoflavitalea
	Cluster_727 Actinobacteriota,Actinobacteria,Streptomycetales,Streptomyetaceae,Streptomyces
<b>J19/S19</b>	Cluster_335 Bacteroidota,Bacteroidia,Chitinophagales,Chitinophagaceae,Niastella
	Cluster_636 Bdellovibrionota,Bdellovibrionia,Bdellovibrionales,Bdellovibrionaceae,Bdellovibrio
<b>Bacteria</b>	
<b>Merlot</b>	
<b>S18</b>	<b>Cluster_63</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Burkholderiales,Comamonadaceae,Ideonella
	Cluster_119 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Rhizobiaceae,Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium
	<b>Cluster_208</b> Dependientiae,Babeliae,Babeliales,Vermiphilaceae,unknown genus
	Cluster_261 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Rhizobiaceae,Aminobacter
	Cluster_301 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	<b>Cluster_351</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Hyphomonadaceae,Hirschia
	<b>Cluster_446</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Brevundimonas
	<b>Cluster_469</b> Bacteroidota,Bacteroidia,Sphingobacteriales,Sphingobacteriaceae,Pedobacter
	Cluster_605 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Asticcacaulis
	Cluster_627 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rickettsiales,SM2D12,unknown genus

Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

	<b>Cluster_631</b> Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	Cluster_673 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Enterobacteriaceae,Kosakonia
<b>J19</b>	Cluster_399 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhodobacterales,Rhodobacteraceae,Rhodobacter
	<b>Cluster_919</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Burkholderiales,Comamonadaceae,Multi-affiliation
<b>S19</b>	none
<b>S18/J19</b>	Cluster_36 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Burkholderiales,Comamonadaceae,Acidovorax
	Cluster_333 Bacteroidota,Bacteroidia,Chitinophagales,Chitinophagaceae,Ferruginibacter
	Cluster_383 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Erwiniaceae,Erwinia
	<b>Cluster_437</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Legionellales,Legionellaceae,Legionella
	<b>Cluster_508</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Phenyllobacterium
	Cluster_582 Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Burkholderiales,Comamonadaceae,unknown genus
	Cluster_711 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	Cluster_729 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	<b>Cluster_812</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Brevundimonas
	Cluster_948 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Sphingomonadales,Sphingomonadaceae,Sphingobium
<b>S18/S19</b>	Cluster_77 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Sphingomonadales,Sphingomonadaceae,Novosphingobium
	Cluster_85 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Rhizobiaceae,Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium
	Cluster_148 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	Cluster_295 Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Rhizobiales,Rhizobiaceae,Mesorhizobium

Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

	<b>Cluster_375</b> Proteobacteria,Alphaproteobacteria,Caulobacterales,Caulobacteraceae,Brevundimonas
	<b>Cluster_414</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Pectobacteriaceae,Pectobacterium
	<b>Cluster_574</b> Actinobacteriota,Actinobacteria,Streptomyetales,Streptomyetaceae,Streptomyces
	Cluster_583 Actinobacteriota,Actinobacteria,Streptomyetales,Streptomyetaceae,Streptomyces
	<b>Cluster_608</b> Bacteroidota,Bacteroidia,Sphingobacteriales,Sphingobacteriaceae,Sphingobacterium
	<b>Cluster_677</b> Proteobacteria,Gammaproteobacteria,Enterobacterales,Enterobacteriaceae,Kosakonia
<b>J19/S19</b>	Cluster_497 Bacteroidota,Bacteroidia,Flavobacteriales,Flavobacteriaceae,Flavobacterium
	Cluster_581 Bacteroidota,Bacteroidia,Sphingobacteriales,Sphingobacteriaceae,Pedobacter
<b>Fungi</b>	<b>Specific sequence clusters</b>
<b>Carbernet Sauvignon</b>	
<b>S18</b>	Cluster_196 Basidiomycota,undefined,Tremellomycetes,Tremellales,undefined,Cryptococcus
	Cluster_199 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Xylariales,Amphisphaeriaceae,Pestalotiopsis
	Cluster_201 Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Agaricales,Physalacriaceae,Armillaria
	Cluster_233 Chytridiomycota,undefined,Multi-affiliation,Multi-affiliation,Multi-affiliation,Multi-affiliation
	<b>Cluster_278</b> Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Agaricales,Physalacriaceae,Armillaria
	Cluster_302 Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Gomphales,Gomphaceae,Multi-affiliation
	Cluster_350 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Hypocreales,undefined,Fusarium
	Cluster_157 Ascomycota,Pezizomycotina,Pezizomycetes,Pezizales,Pyronemataceae,Tarzetta

Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

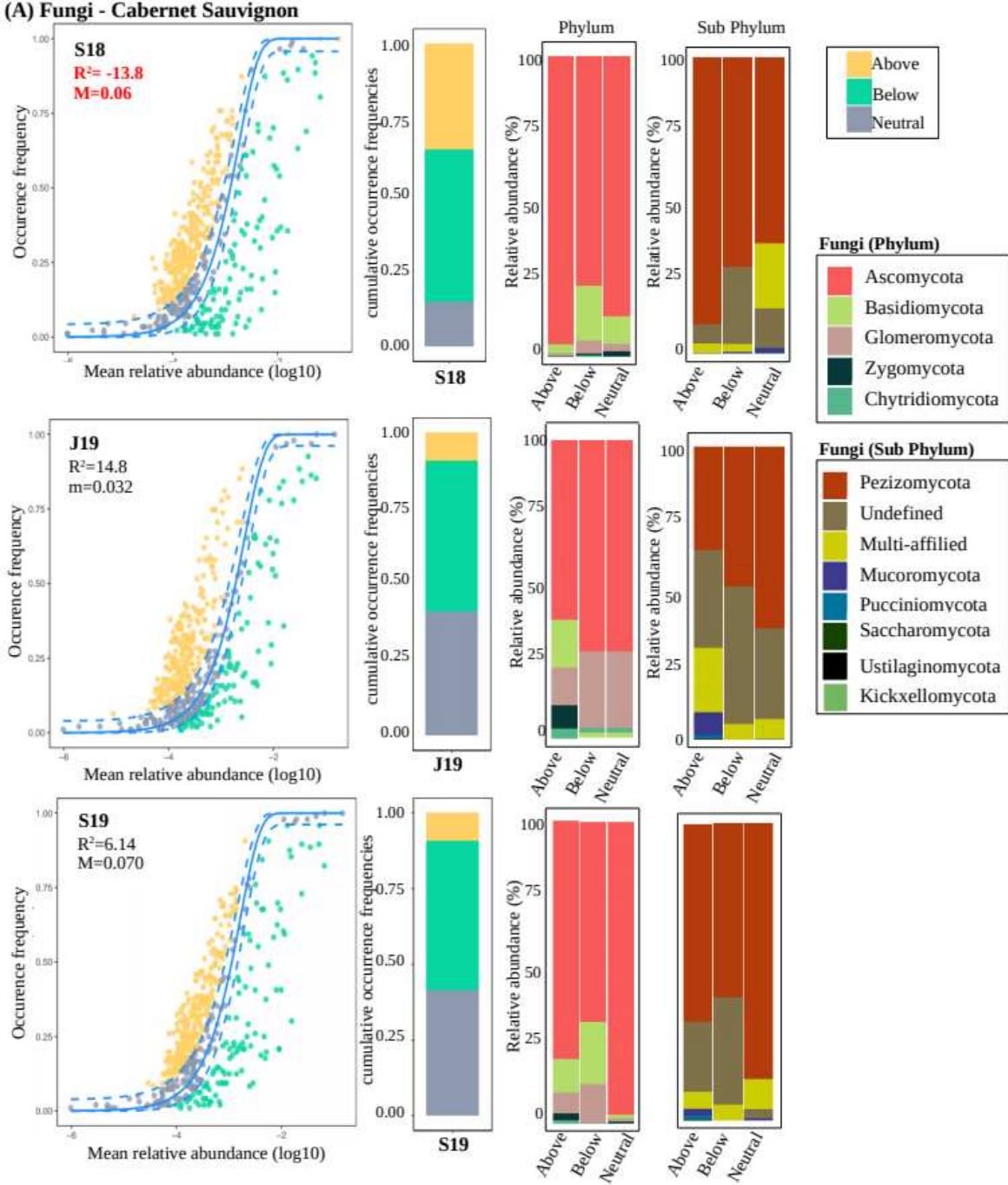
<b>J19</b>	Cluster_253 Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Diaporthales, Multi-affiliation, Multi-affiliation
	Cluster_317 Zygomycota, Mucoromycotina, undefined, Endogonales, Endogonaceae, Endogone
	Cluster_393 Basidiomycota, Ustilaginomycotina, Exobasidiomycetes, Exobasidiales, Exobasidiaceae, Exobasidium
<b>S19</b>	Cluster_152 Basidiomycota, undefined, Agaricomycetes, Agaricales, Physalacriaceae, Physalacria
	Cluster_231 Ascomycota, undefined, undefined, undefined, undefined, undefined
	Cluster_301 Basidiomycota, undefined, Agaricomycetes, Thelephorales, Thelephoraceae, Tomentella
	Cluster_371 Basidiomycota, undefined, Agaricomycetes, Agaricales, Multi-affiliation, Multi-affiliation
<b>S18/J19</b>	Cluster_433 Basidiomycota, undefined, Multi-affiliation
<b>S18/S19</b>	Cluster_241 Basidiomycota, undefined, Agaricomycetes, Agaricales, Bolbitiaceae, Agrocybe
	Cluster_268 Ascomycota, Pezizomycotina, Pezizomycetes, Pezizales, Sarcoscyphaceae, Kompsoscypha
	Cluster_358 Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, undefined, Apiosporaceae, Arthrimum
	Cluster_360 Basidiomycota, undefined, Agaricomycetes, Agaricales, Tricholomataceae, Multi-affiliation
	Cluster_406 Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiales, Trichocomaceae, Multi-affiliation
	Cluster_521 Ascomycota, Pezizomycotina, Multi-affiliation, Multi-affiliation, Multi-affiliation, Multi-affiliation
<b>J19/S19</b>	Cluster_194 Ascomycota, undefined, undefined, undefined, undefined, Ochroconis
	Cluster_251 Ascomycota, undefined, undefined, undefined, undefined, Anguillospora
	Cluster_368 Glomeromycota, undefined, Glomeromycetes, Diversisporales, Acaulosporaceae, Acaulospora
<b>Fungi</b>	

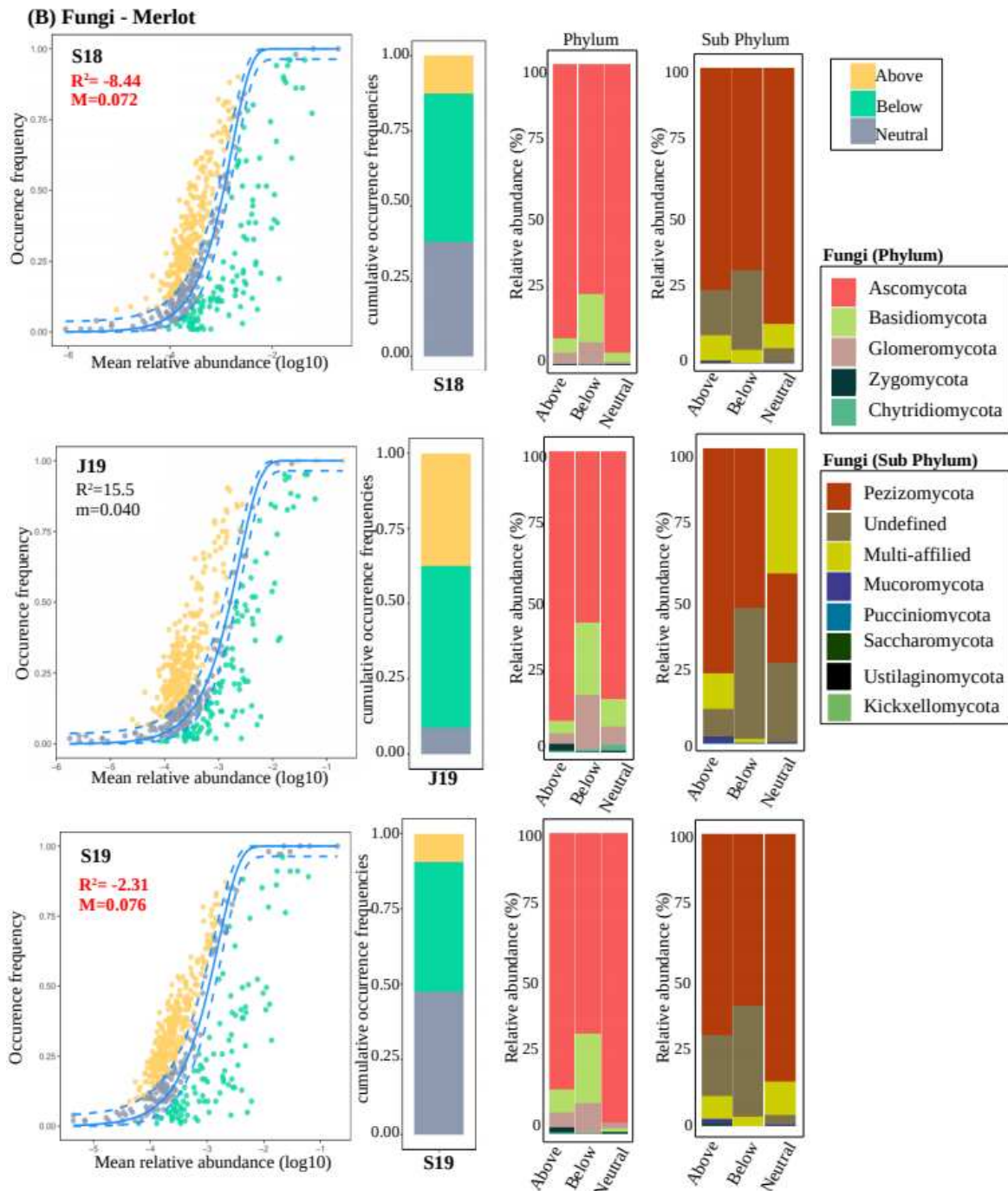
Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

<b>Merlot</b>	
<b>S18</b>	<b>Cluster_278</b> Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Agaricales,Physalacriaceae,Armillaria
	Cluster_331 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Microascales,undefined,Ceratocystis
	Cluster_358 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,undefined,Apiosporaceae,Arthrinium
	Cluster_388 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Multi-affiliation,Multi-affiliation,Multi-affiliation
	Cluster_399 Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Agaricales,Physalacriaceae,Armillaria
<b>J19</b>	Cluster_231 Ascomycota,undefined,undefined,undefined,undefined,undefined
	Cluster_250 Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Atheliales,Atheliaceae,Cristinia
	Cluster_287 Chytridiomycota,undefined,undefined,undefined,undefined,undefined
	Cluster_368 Glomeromycota,undefined,Glomeromycetes,Diversisporales,Acaulosporaceae,Acaulospora
<b>S19</b>	none
<b>S18/J19</b>	Cluster_89 Ascomycota,Pezizomycotina,Dothideomycetes,Capnodiales,Davidiellaceae,Cladosporium
	Cluster_201 Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Agaricales,Physalacriaceae,Armillaria
	Cluster_253 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Diaporthales,Multi-affiliation,Multi-affiliation
	Cluster_317 Zygomycota,Mucoromycotina,undefined,Endogonales,Endogonaceae,Endogone
	Cluster_407 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Hypocreales,undefined,Fusarium
<b>S18/S19</b>	Cluster_21 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Microascales,undefined,Ceratocystis
	Cluster_152 Basidiomycota,undefined,Agaricomycetes,Agaricales,Physalacriaceae,Physalacria
	Cluster_189

Chapitre 3.2 -Dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne

	Ascomycota,Pezizomycotina,Laboulbeniomyces,Pyxidiophorales,Pyxidiophoraceae,Pyxidiophora
	Cluster_223 Basidiomycota,Pucciniomycotina,Agaricostilbomyces,undefined,undefined,Sporobolomyces
	Cluster_242 Ascomycota,Pezizomycotina,Pezizomycetes,Pezizales,Pyronemataceae,Multi-affiliation
	Cluster_342 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Coniochaetales,Coniochaetaceae,Multi-affiliation
<b>J19/S19</b>	Cluster_190 Glomeromycota,undefined,Glomeromycetes,Glomerales,Glomeraceae,undefined
	Cluster_211 Glomeromycota,undefined,Glomeromycetes,Glomerales,Glomeraceae,undefined
	Cluster_449 Ascomycota,Pezizomycotina,Sordariomycetes,Hypocreales,undefined,Fusarium



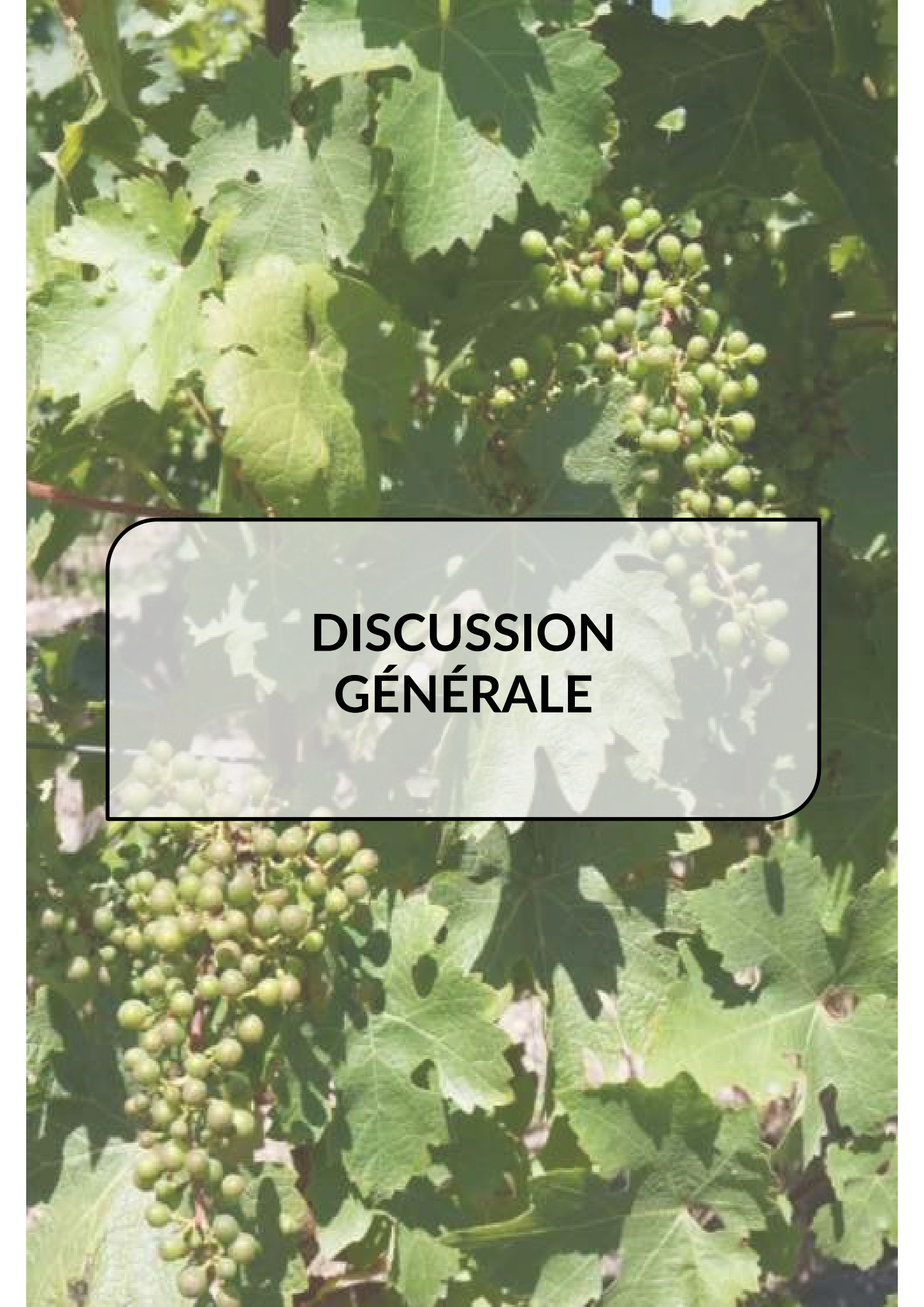


**Fig. S4. Partition of deterministic and stochastic processes of fungal community assembly (neutral community model (NCM)).**

(A) S18/J19/S19-Cabernet Sauvignon and (B) S18/J19/S19-Merlot, served as the community source to create neutral models. The first graphs show the occurrence frequencies predicted by the NCM. The sequence clusters that occurred more frequently than expected are shown as yellow dots while those that occurred less frequently are in green. The solid blue line indicates the best fit of the model and the dashed lines show the 95% confidence intervals. The dashed lines indicate the neutrality envelope. “m” (estimate rate) and  $R^2$  ( $0 < R^2 \leq 1$ , adequacy of the model fitting) are indicated on the graphs. The single bar charts indicate cumulative sequence cluster occurrence frequencies of above, neutral and below partitions; the combined bar charts show the ranked cumulative relative abundance of taxonomic groups (phylum and sub phylum) of the three sequence clusters.







**DISCUSSION  
GÉNÉRALE**



## Discussion générale

La vision anthropocentrée du vivant et les limitations techniques ont pendant longtemps borné les investigations dans les domaines de la biologie et de l'écologie microbienne. Comprendre que les humains, les animaux, les plantes et tous les écosystèmes sur terre sont colonisés par les microorganismes a permis de redéfinir les limites de la compréhension du fonctionnement de chacune de ces "entités". Comment accepter que nous ne sommes rien sans ces petits microbes, alors que nous sommes, nous même en train de les "observer", et que ces recherches/observations ne seraient en aucun cas possibles sans leur présence et les nombreux rôles vitaux qu'ils assurent pour notre bon fonctionnement... Quelle merveilleuse question, quel beau casse-tête!

Avec la montée en puissance de l'écologie microbienne comme acteur clé dans la compréhension fine des écosystèmes, de nouveaux paradigmes et questionnements sont apparus. Ainsi, la définition même de l'individualité a pu être questionnée (Baptiste *et al.* 2021). Pour une plante qui, contrairement aux animaux, ne peut se mouvoir pour fuir les stress multiples auxquels elle doit faire face, le rôle des microorganismes qui lui sont associés est d'une importance capitale. En faisant ce constat de dépendance (et co-dépendance) et en révélant l'importance des symbiotes d'un organisme pour sa survie, l'émergence d'un concept clé a vu le jour : le concept d'holobionte. Cependant, ce concept, énoncé comme tel et même s'il repose sur des recherches (p.ex. études des coraux, des lichens), peut être perçu que comme "purement théorique" par certains.

Dans cette thèse, nous avons évalué ce concept d'holobionte par l'analyse du microbiote endophyte de plantes chimériques greffées (Chapitre 2). Puis, ayant montré que les assemblages microbiens n'étaient en aucun cas purement stochastiques suggérant donc la validité du concept d'holobionte, nous avons cherché à mieux comprendre les facteurs clés qui façonnent le cortège microbien associé à cet holobionte (Chapitres 3.1 et 3.2). Notre modèle d'étude, la vigne, présente différents avantages, et notamment, le fait que les plantes sont pérennes, génétiquement homogènes et que dans un vignoble donné, les plantes sont généralement cultivées de manière similaire. Grâce à un plan d'échantillonnage spatial et temporel ambitieux et grâce à l'homogénéité relative des vignes au sein du domaine viticole partenaire Château Palmer, nous avons pu montrer que l'hétérogénéité locale des conditions environnementales à petite échelle spatiale (rayon d'étude inférieur à 5 km), que l'âge et le cépage de la vigne ainsi que la période de croissance de la plante (variabilité temporelle selon la date considérée) avaient un fort impact sur la structuration des communautés bactériennes et fongiques de l'endosphère racinaire. Par ailleurs, nous avons mis en lumière, via la mise en place d'expériences pilotes, l'impact de certaines pratiques sur le microbiote de la vigne. Les résultats de cette thèse, qui sont résumés et discutés ci-dessous, étayent les connaissances fondamentales dans le domaine de l'écologie microbienne et offrent de nombreuses pistes de réflexion quant aux pratiques mises en place en champ pour une viticulture durable.

## A. Plantes chimériques, légitimité du concept d'holobionte et preuves empiriques

### I. Déterminisme et validité de l'holobionte

Nos résultats démontrent que les communautés bactériennes de l'endosphère racinaire des plantes non greffées et greffées (les plantes chimériques) sont significativement différentes. L'assemblage de ces communautés peut donc difficilement être perçu comme purement stochastique. Par ailleurs, nous montrons qu'une forte proportion de taxa est sur ou sous-représentée par rapport à l'enveloppe de neutralité dans les plantes chimériques ce qui confirme que les assemblages bactériens sont en partie déterministes et que le microbiote est au moins pour partie activement recruté par la plante hôte. Cette part déterministe de l'assemblage interroge l'existence de phénomènes éco-évolutifs ou co-évolutifs dans un contexte naturel et de culture (Koskella and Bergelson 2020). De plus, en étudiant plus en détail la part activement recrutée de microorganismes par les plantes greffées, on montre que la proportion de ces taxa qui proviennent du porte-greffe est bien plus importante ce qui conforte nos observations sur la structuration des communautés (c'est-à-dire, plus forte influence du porte-greffe sur la composition). Derrière ce recrutement horizontal actif de microorganismes, différents mécanismes ont été mis en avant pour expliquer ces processus déterministes. C'est par exemple le cas de la signalisation moléculaire mise en place au niveau des racines et de la rhizosphère. De nombreux exemples dans la littérature démontrent que les molécules signales émises à l'extérieur des racines permettent la colonisation de l'endosphère racinaire sous le contrôle des racines et donc de la plante (p.ex. la revue de Jacoby, Koprivova and Kopriva 2021). Ces phénomènes peuvent être, à première vue, interprétés comme sous le contrôle de la plante elle-même en fonction de ses besoins. Cependant, de nouvelles études montrent que le microbiote endosphérique de la plante est capable de reprogrammer les voies métaboliques de son hôte, entraînant des modifications de production des métabolites primaires et secondaires sécrétés par la plante (Kaur and Suseela 2020). Le microbiote semble donc influencer sa propre succession. L'interaction complexe entre la plante hôte, le microbiote et l'environnement démontre l'existence d'une entité fonctionnelle à part entière (holobionte), capable de tamponner les variations extrêmes de l'environnement (Wahdan *et al.* 2021).

### II. Déterminants des communautés microbiennes des plantes chimériques

Nos résultats démontrent un effet important du porte-greffe dans le recrutement et la structuration des communautés bactériennes des racines des deux modèles biologiques, bien que le greffon et l'interaction des deux parties façonnent également ces communautés. Nos résultats rejoignent les conclusions de plusieurs études récentes qui soulignent la "domination" du porte-greffe dans la structuration des communautés de plantes greffées et ce, sur différents modèles biologiques (p.ex. vigne, pastèques/courge, tomate, pommier) et différents compartiments d'intérêt dans l'analyse des

## Discussion générale

plantes (p.ex. racines, rhizosphère) (D'Amico *et al.* 2018; Liu *et al.* 2018; Marasco *et al.* 2018; Poudel *et al.* 2018; Ruan *et al.* 2020). Dans ces études, les auteurs soulignent également l'importance du génotype du porte-greffe dans la composition des communautés microbiennes (D'Amico *et al.* 2018; Liu *et al.* 2018; Marasco *et al.* 2018; Poudel *et al.* 2018). Dans notre expérience, un génotype donné (le Chenin par exemple) peut être soit porte-greffe soit greffon suivant la combinaison. Malgré cela, on observe de manière récurrente l'effet marqué du porte-greffe dans la structuration des communautés endophytes des racines. Ce dernier résultat questionne avec intérêt l'interprétation souvent mise en avant dans la littérature scientifique, de l'effet plus important du génotype du porte-greffe que des assemblages greffons/porte-greffes.

Par ailleurs, dans une expérience pilote de l'axe 2 de cette thèse (impact des pratiques), non présenté dans ce manuscrit (voir l'avant-propos de ce manuscrit), nous avons pu montrer que l'origine du greffon avait également une importance capitale dans la composition bactérienne et fongique de l'endosphère racinaire de jeunes pieds de vigne. En effet, nous avons greffé sur un même clone de porte-greffe, le même clone de greffon de Cabernet-Sauvignon du même âge, mais provenant de deux sites géographiques différents. Dans cette expérience, nous avons testé l'effet de l'origine du greffon et du traitement à l'eau chaude (TEC, p.ex. Gramaje, Úrbez-Torres and Sosnowski 2018) sur la structuration des communautés fongiques et bactériennes. Nos résultats suggèrent que 6 et 18 mois après greffage, le facteur déterminant de la composition des communautés microbiennes et de la richesse des assemblages microbiens dès le plus jeune stade de la vie d'une vigne greffée, est indéniablement le lieu où les greffons ont été prélevés. Notre étude pilote suggère que la préférence d'hôte, c'est-à-dire l'association préférentielle d'un microbiote à un cépage ou une espèce donnée, s'étend également à la plante greffée, sous l'action du greffon sur le recrutement des microorganismes au niveau racinaire et que cette association préférentielle semble également déterminée par le lieu de croissance d'une plante (*terroir*). Cependant, afin de conforter nos observations, il faudrait réaliser une expérience de plus grande ampleur, en utilisant une plus large gamme de types de greffons (différentes origines et cépages) afin d'identifier dans quelle mesure cette propriété est liée en particulier à certains cépages et contextes régionaux.

L'un des résultats clé de cette thèse est la mise en évidence d'un recrutement actif des bactéries de l'endosphère racinaire sous influence du porte-greffe des plantes greffées (chimériques) et la démonstration expérimentale de la légitimité du concept d'holobionte. Dans notre étude, nous nous sommes concentrés exclusivement sur l'endosphère racinaire des plantes chimériques, bio-compartiment associé à la partie basse de la plante greffée, le porte-greffe. Puisque ces plantes greffées sont organisées en deux parties que l'on peut considérer comme "distinctes", une prochaine étape serait d'analyser le microbiote de la phyllosphère qui représente la fraction de microorganismes associés aux greffons. De ce fait, il sera possible, si les résultats démontrent un recrutement actif et déterminé du microbiote associé aux feuilles, d'ajouter des preuves empiriques en faveur du concept d'holobionte.

## Discussion générale

Par ailleurs, les feuilles, et donc les greffons, sont le siège de la photosynthèse. Ce processus indissociable de la production de carbone, qui est en grande partie alloué aux microorganismes en échange de fonctions écologiques clés pour la plante, est donc sensiblement impliqué dans les processus de recrutement microbien. Pourtant, une récente étude portant sur le microbiote de la tomate a démontré un effet significativement plus fort du génotype du porte-greffe sur la structuration des communautés microbiennes de la phyllosphère (Toju, Okayasu and Notaguchi 2019). En comparant en parallèle, l'effet du greffon et du porte-greffe sur le microbiote des racines et de la phyllosphère, il sera possible de savoir si l'effet déterminant du porte-greffe dans l'assemblage des communautés microbiennes se maintient quel que soit le bio-compartiment analysé. De plus, afin de conforter nos résultats obtenus sur la communauté bactérienne, il sera important de valider nos observations sur le mycobiote associé aux plantes chimériques. En effet, la majeure partie des études se cantonnent à l'analyse des bactéries. Cependant, les champignons, et notamment, les champignons mycorhiziens, sont largement impliqués dans la survie, la nutrition et la croissance des plantes. Connaître le comportement de la communauté fongique associée aux plantes chimériques permettrait d'augmenter les preuves empiriques d'un recrutement actif par l'holobionte et ainsi, d'apporter une nouvelle preuve de l'existence d'une telle unité fonctionnelle.

Même si un effet "plante" est indéniablement impliqué dans le recrutement actif de microorganismes (*host preference*) (Chapitre 2), une grande hétérogénéité de diversité à l'échelle individuelle est généralement constatée et questionne de ce fait, l'existence d'autres facteurs dans la gouvernance des assemblages microbiens constitutifs de l'holobionte (Chapitres 3.1 et 3.2).

## **B. Facteurs déterminant la variabilité spatio-temporelle des assemblages microbiens**

### **I. Facteurs environnementaux, pratiques viticoles, spécificités de la plante**

#### **a. Facteurs environnementaux**

Nos résultats mettent en évidence un effet des paramètres physico-chimiques du sol sur la richesse et la diversité des bactéries et champignons endophytes des racines de vigne à petite échelle. Les facteurs environnementaux semblent façonner les communautés de bactéries et de champignons par la modification de l'identité des espèces et, dans une moindre mesure, en modifiant leur richesse et/ou leur diversité. Plus précisément, via l'utilisation de deux échelles d'analyse : l'échelle du pied de vigne individuel (échelle  $\alpha$ ) et l'échelle d'une parcelle (échelle  $\gamma$ ), nous avons révélé que la plupart des effets des facteurs testés diffèrent selon l'échelle d'analyse considérée. Ainsi, les effets du pH et de la matière organique sur la richesse bactérienne et du cépage sur la richesse fongique sont significatifs à l'échelle de l'individu (échelle  $\alpha$ ) mais pas à l'échelle de la parcelle (échelle  $\gamma$ ). A l'inverse, certaines relations entre facteurs et communautés microbiennes sont significatives seulement à l'échelle de la parcelle.

## Discussion générale

Parce que l'échelle globale de  $\gamma$ -diversité correspond à la somme de  $\alpha$ -diversité +  $\beta$ -diversité (la  $\beta$ -diversité mesure la différence entre les individus), une faible  $\beta$ -diversité (c'est-à-dire que la  $\gamma$ -diversité équivaut la  $\alpha$ -diversité) pourrait conduire à des réponses similaires aux facteurs environnementaux aux échelles  $\alpha$  et  $\gamma$ , alors qu'une forte  $\beta$ -diversité pourrait conduire à des réponses divergentes entre les échelles  $\alpha$ - et  $\gamma$ -diversité.

Nos résultats démontrent un fort effet du pH sur la structuration des communautés bactériennes et fongiques et corroborent les observations de différentes études (Burns *et al.* 2015; Liang *et al.* 2019; Pacifico *et al.* 2019). Le pH est largement reconnu comme facteur déterminant de l'assemblage des communautés microbiennes par son action sur la régulation de l'activité enzymatique des microorganismes ou par son effet régulateur des ions libres dans le sol, et de ce fait, des nutriments accessibles (Burns *et al.* 2015; Liang *et al.* 2019; Pacifico *et al.* 2019). Nos résultats suggèrent que le rapport C/N impacte seulement les communautés fongiques des racines de vigne et particulièrement, le groupe des gloméromycètes, champignons symbiotiques. Le rapport C/N est généralement considéré comme un indicateur clé de l'accessibilité des nutriments (Zhang and Elser 2017) et les changements du rapport C/N du sol semblent donc avoir un fort impact sur les processus de biosynthèse fongique ainsi que sur les stratégies de recherche de nutriments (Cleveland and Liptzin 2007). Ainsi, nos résultats suggèrent que si le rapport C/N diminue (la teneur en N est plus élevée), les plants de vigne pourraient avoir un accès plus facile et direct à l'azote, ce qui impacterait directement la communauté des gloméromycètes.

### b. Facteurs inhérents à la plante

Nous montrons également dans ce chapitre 3.1, un effet peu connu, l'influence de l'âge de la vigne et du cépage, sur la composition microbienne. Nos résultats suggèrent que ces paramètres induisent un changement dans la composition en microorganismes plutôt que d'affecter leur richesse. Une interprétation possible de la variabilité en fonction du cépage est l'association d'un microbiote donné à son hôte en raison de la filtration des espèces pionnières au profit des taxa sélectionnés par l'hôte. En accord avec cette interprétation, différents auteurs ont rapporté des effets de filtration des racines (p.ex. Bulgarelli *et al.* 2012) en fonction du type de plante et/ou du génotype de la plante (p.ex. Zarronaindia *et al.* 2015; Marasco *et al.* 2018; Berlanas *et al.* 2019; Martínez-Diz *et al.* 2019) impliqués dans le recrutement des microorganismes. Nos résultats montrent également un effet important de l'âge de la vigne sur la structuration des communautés. Cela peut être lié à une succession de processus impliqués dans la colonisation des racines par les microorganismes au cours de la vie de la vigne (Chang and Turner 2019) et selon son stade de développement (voir A-II de la discussion générale).



### c. Complexité du terroir microbiologique et pratiques

Comme décrit dans l'introduction générale de la thèse, le *terroir microbiologique* de la vigne n'est pas seulement défini par les caractéristiques physico-chimiques du sol et le climat. Les pratiques mises en place à la vigne peuvent profondément impacter le microbiote de la vigne et forment, avec les déterminants environnementaux et temporels, la complexité, souvent unique, d'un *terroir* particulier. Durant cette thèse, et comme expliqué dans l'avant-propos de ce manuscrit, nous avons réalisé des expériences pilotes visant à analyser l'impact des pratiques sur le microbiote de la vigne (travaux non présentés dans ce manuscrit).

Nos résultats montrent que le type d'enherbement modifie profondément le mycobiote de la vigne. En plus d'impacter l'identité des champignons constituant les communautés, l'enherbement modifie leur richesse et leur diversité. On démontre un effet clairement négatif du sol nu (travail fréquent de l'enherbement spontané pour obtenir un sol nu) sur la composition du mycobiote de la vigne: plus faible richesse et diversité en champignons dans les racines. L'enherbement, qu'il soit naturel ou semé, semble avoir, quant à lui, un effet positif sur le pool global de champignons. Ces résultats sont en adéquation avec différentes études récentes qui montrent un effet clairement bénéfique d'un enherbement diversifié sur les champignons mycorhiziens (Cloutier *et al.* 2020) et sur la communauté microbienne dans son ensemble (Burns *et al.* 2016; Martínez-García *et al.* 2018). Sur la base des connaissances théoriques (hypothèse de la complémentarité fonctionnelle, notamment Loreau 2001) et expérimentales de l'écologie, la recherche de situations maximisant la diversité sont à rechercher (Tilman 2001; Tilman *et al.* 2002). Ici l'augmentation de la richesse et de la diversité du mycobiote endosphérique racinaire observée sous l'effet de l'enherbement est évidente. Un des principaux mécanismes mis en avant pour expliquer les variations de diversité microbienne sous l'effet de l'enherbement est l'augmentation de la matière organique qui améliore la disponibilité des nutriments pour les microorganismes (p.ex. Belmonte *et al.* 2018; García-Díaz *et al.* 2018). Par ailleurs, si on considère l'effet des espèces voisines sur le mycobiote d'une plante cible (Bittebiere *et al.* 2020; Mony *et al.* 2020b), il semble possible de pouvoir "optimiser" la composition du mycobiote de la vigne en manipulant la composition des communautés végétales constitutives de l'enherbement des inter-rangs. Afin d'étoffer ce travail, une prochaine étape importante serait d'étudier l'impact de l'enherbement sur les bactéries associées à la vigne afin de comprendre l'influence de l'enherbement sur le microbiote dans son ensemble.

La conduite de la vigne, qu'elle soit biologique, conventionnelle ou biodynamique, a également un impact sur les bactéries et champignons de l'endosphère racinaire. Cependant, nos résultats ne révèlent pas de motifs tranchés entre d'une part, une viticulture conventionnelle et en transition biologique récente (3 ans), et d'autre part, entre une viticulture biologique et biodynamique. Les résultats observés montrent que la conduite en viticulture biologique (versus conventionnelle) influence

## Discussion générale

le microbiote des vignes bien que les effets enregistrés restent faibles. Il est important de noter que dans cette étude, malgré une dissociation des deux pratiques, le domaine viticole applique sensiblement les mêmes conduites en conventionnelle et biologique. De plus, la transition biologique est très récente et une des inconnues est le temps de réponse du compartiment microbien au changement de pratiques viticoles, c'est-à-dire le nombre d'années nécessaires pour que l'influence de la conduite en viticulture biologique soit perceptible au niveau de la composition microbiologique des sols et par extension, les microorganismes associés aux racines de vigne. La pratique biologique agit surtout sur la richesse du pool microbien et la présence d'espèces représentées en faible abondance, et ses effets semblent plus marqués pour les bactéries que pour les champignons. Cette dernière observation conforte deux études récentes qui démontrent une réponse plus marquée au type de viticulture pour les bactéries par rapport aux champignons (Likar *et al.* 2017; Hendgen *et al.* 2018). Dans l'ensemble, nos résultats ne renforcent pas les études existantes qui démontrent pourtant un effet généralement bénéfique de la viticulture biologique sur la diversité microbienne. La plupart de ces études comparent les pratiques conventionnelles et biologiques déjà mises en place depuis plusieurs années et s'intéressent principalement aux microorganismes du sol et, plus rarement, aux microorganismes associés au sarment (Vitulo *et al.* 2019), à la phyllosphère (Castañeda *et al.* 2018), ou encore aux baies (Morrison-Whittle, Lee and Goddard 2017; Vitulo *et al.* 2019). Seules deux études ont analysé l'effet du type de pratique sur le microbiote racinaire ou de la rhizosphère et démontrent un effet bénéfique de l'enherbement sur la diversité microbienne, pratique associée généralement aux conduites plus "douces" (Radić *et al.* 2014; Vega-Avila *et al.* 2015).

Concernant la comparaison entre viticulture biologique et biodynamique, nous ne montrons pas non plus de grandes différences de composition et de richesse entre les deux types de pratiques. Nous constatons tout de même que le type de pratique impacte la richesse de certains phyla (gamma-protéobactéries, actinobactéries, basidiomycètes et chytridiomycètes). Nos résultats rejoignent les quelques études qui ont cherché à faire la comparaison de ces deux types de pratiques. Une partie de ces articles repose sur un dispositif expérimental à long terme mis en place en Allemagne sur des vignobles de Riesling (vignes âgées de 25 ans) dans lequel, des parcelles similaires sont soit travaillées en viticulture biologique, soit en viticulture biodynamique (Kecskeméti, Berkelmann-Löhnertz and Reineke 2016; Hendgen *et al.* 2018; Di Giacinto *et al.* 2020). Les auteurs notent que la pratique en biodynamie n'a pas d'effet sur les communautés bactériennes des baies, sur la richesse fongique et bactérienne du sol, sur la composition fongique du sol, ou encore sur l'abondance en champignons mycorhiziens à arbuscules (Kecskeméti, Berkelmann-Löhnertz and Reineke 2016; Hendgen *et al.* 2018; Di Giacinto *et al.* 2020). Cependant, une méta-analyse récente (350 études regroupant des analyses aux Etats-Unis et en Espagne) révèle que les réseaux de co-occurrence de champignons associés à des échantillons de sol de parcelles en biodynamie sont plus complexes avec un degré de modularité et un coefficient de regroupement plus élevé (Ortiz-Álvarez *et al.* 2020).

Il existe encore peu d'études qui comparent les deux types de pratiques "douces" (biologique et biodynamique; pour une revue de la littérature, se référer à Cravero 2019) et les constatations réalisées par les différents auteurs sont les suivantes : l'influence de la biodynamie sur les microorganismes est probablement plus faible que lors du passage de conventionnel au biologique dont les pratiques d'enherbement, travail du sol, composts, sont celles induisant les modifications les plus marquées. Il faut aussi noter que la viticulture est une monoculture pérenne sans rotation, ce qui peut expliquer que la différence soit moins marquée que pour d'autres systèmes. Le manque de diversité est probablement un facteur limitant. Il est toutefois intéressant de voir que l'enherbement a un effet important sur le compartiment microbien car il apporte de la diversité cultivée. Pour appuyer cette étude et la littérature existante, il serait intéressant d'augmenter le nombre de pieds de vigne échantillonnés et ce, sur plusieurs parcelles et plusieurs domaines afin de savoir si les tendances observées dans cette étude sont retrouvées dans d'autres systèmes en biologie et biodynamie. Par ailleurs, il serait intéressant de mesurer d'autres variables sur la vigne afin d'identifier si ces effets de faible intensité sur le microbiote ont un effet sur les caractéristiques physiologiques, morphologiques et la production, de manière similaire à ce qui est fait sur le site d'étude à long terme existant en Allemagne.

## II. Variabilité temporelle

### a. Dynamique temporelle intra- et inter-annuelle

En plus des déterminants environnementaux, spécifiques à la vigne et liés aux pratiques, notre étude souligne l'importance de la dynamique temporelle dans l'assemblage des communautés microbiennes de l'endosphère racinaire. En effet, nos résultats dévoilent des variations marquées du microbiote en fonction des dates d'échantillonnage, avec des changements dans la composition, la richesse et la sélection de taxa spécifiques.

Nos résultats rejoignent des études antérieures et récentes qui soulignent l'existence de variations dans le temps, à la fois entre les saisons, et même entre les années pour les espèces végétales pérennes, dans l'assemblage des communautés microbiennes (Zarraonaindia *et al.* 2015; Berlanas *et al.* 2019; Liu and Howell 2020). Différents mécanismes sont mis en avant pour expliquer cette variabilité temporelle. Ainsi, le stade de développement de la plante et les changements dans ses besoins associés peuvent conditionner le type de microorganismes recrutés selon leurs fonctions écologiques (Mougel *et al.* 2006; Berg and Smalla 2009; Jumpponen and Jones 2010; Chaparro, Badri and Vivanco 2014; Copeland *et al.* 2015; Grady *et al.* 2019). De plus, des changements d'architecture des racines dans le temps (forme, caractéristiques et fonctions) peuvent modifier l'espace disponible pour la colonisation microbienne (Pérez-Jaramillo *et al.* 2017; Saleem *et al.* 2018; Iannucci *et al.* 2021). Par ailleurs, selon la saison et l'année, les conditions environnementales (p.ex. le climat) peuvent varier et influencer les conditions physico-chimiques du sol (accessibilité à l'eau, pH, ratio C/N) impactant de ce fait, les assemblages microbiens (Liu *et al.* 2019; Liu and Howell 2020). En effet, nous avons montré dans le

## Discussion générale

chapitre 3.1, un fort effet des paramètres du sol, et notamment le pH, le ratio C/N et le contenu en matière organique, sur la composition et la richesse en microorganismes. Ces changements de caractéristiques du sol sont donc supposés impacter le pool primaire de microorganismes recrutables par la plante.

Dans ce chapitre, nos résultats mettent particulièrement en évidence des changements microbiens intra-annuels (entre les périodes de floraison et de maturité des baies, juin et septembre) plus marqués que ceux observés entre deux années. En effet, les communautés bactériennes et fongiques sont plus similaires entre les deux dates de septembre (baies mures avant vendange) en comparaison à juin (floraison). Nos résultats indiquent qu'en septembre, les pieds de vigne échantillonnés sont plus riches en actinobactéries et moins riches en glomérromycètes en comparaison à la campagne de juin. De plus, nous montrons, via l'utilisation de modèles nuls, une plus grande proportion d'actinobactéries "recrutées" activement par la plante hôte en septembre ce qui confirme nos observations à l'échelle des analyses de composition et de richesse. Les actinobactéries sont généralement décrites comme améliorant la nutrition minérale et hydrique des plantes ainsi que productrices de molécules antibiotiques (*Streptomyces*) (Doubou et al. 2005; Schrey and Tarkka 2008; Govindasamy, Franco and Gupta 2014). De ce fait, ces actinobactéries peuvent avoir été davantage recrutées par l'hôte en septembre pour faire face aux variations de précipitations et de rayonnement solaire et donc, pour amortir les stress abiotiques à la fin de l'été. La plus forte richesse en glomérromycètes en juin en comparaison à septembre, peut être corrélée au stade de développement de la plante (croissance racinaire active en juin) et ses besoins au cours de la saison. En effet, les glomérromycètes (et en particulier, les champignons mycorrhiziens à arbuscules - AMF) sont largement impliqués dans l'approvisionnement en minéraux et en eau des plantes et améliorent leur résistance aux maladies (Smith and Read 2009). Nos résultats soutiennent d'autres études qui ont montré des changements dans la composition en champignons mycorrhiziens au cours du temps, selon le stade de développement de la plante (Vandenkoornhuyse et al. 2002; Bennett et al. 2013).

Enfin, dans ce chapitre, nous démontrons l'existence de processus déterministes dans le recrutement de bactéries par la plante hôte, et ce, aux trois dates échantillonnées. Nos résultats suggèrent une filtration fine des bactéries au cours du temps. Comme expliqué précédemment dans le cas des actinobactéries, cette sélection spécifique de taxa clés par la plante hôte peut être interprétée comme un processus visant à faire face à des conditions environnementales particulières ou à répondre à des besoins spécifiques. De nombreuses études expliquent cette sélection et la régulation des communautés microbiennes rhizosphériques, et par extension, des communautés endosphériques, par les exsudats racinaires (p.ex. Sasse, Martinoia and Northen 2018). Cependant, l'existence d'autres mécanismes de communication entre les différentes branches du vivant sont de plus en plus étudiés. C'est par exemple le cas de médiateurs miRNAs produits à la fois par les plantes et les microorganismes (c'est-à-dire des "miRNA-like") qui semblent être fortement impliqués dans la

modulation des communautés microbiennes de la rhizosphère et par extension, de l'endosphère racinaire (Middleton *et al.* 2021).

Il semble important d'étendre les analyses de la dynamique temporelle du microbiote des plantes en augmentant les dates de prélèvement afin de couvrir entièrement la dynamique annuelle et les changements clés de la phénologie de la plante. Cette analyse gagnerait en puissance en analysant cette dynamique sur plusieurs années et à différentes classes d'âge de la plante. De plus, cette étude pourrait être enrichie par la quantification de l'effet relatif des trois "temps" (c'est-à-dire, intra-annuel, inter-annuel et vie de la plante) car, à l'échelle de notre analyse, nous avons regardé séparément les effets à court terme (dynamique annuelle et entre deux années) et à long terme (assemblages au cours de la vie).

### b. Changements au cours de la vie de la vigne

Pour compléter l'analyse de la dynamique temporelle, il est également important d'analyser l'effet de l'âge des plantes sur les assemblages microbiens, particulièrement chez la vigne qui est une plante pérenne. En effet, il est maintenant accepté que selon l'âge de la plante, via la succession naturelle (p.ex. Fierer *et al.* 2010) ou selon les besoins à un stade de croissance (p.ex. Xiong *et al.* 2021), le microbiote va sensiblement changer. L'ordre d'arrivée des espèces peut avoir un impact sur le développement ultérieur de la communauté (Werner and Kiers 2015) (*priority effect*, colonisation par les microorganismes pionniers capables de passer les barrières physiques jusqu'à l'endosphère). Par ailleurs, une forte filtration par la plante hôte peut moduler les assemblages, via son système immunitaire par exemple, et peut conduire à des variations dans la composition de la communauté, par le recrutement de microorganismes plus adaptés (Vandenkoornhuysen *et al.* 2002) (*host preference*, préférence d'hôte et recrutement préférentiel). De plus, il a récemment été démontré que les plantes peuvent laisser une empreinte de leur microbiote endosphérique racinaire dans le sol, réservoir primaire de microorganismes pour les plantes (Vannier *et al.* 2020).

Durant cette thèse, en plus de la dynamique intra-annuelle et entre deux années, nous avons cherché à mieux définir les changements dans les communautés microbiennes endosphériques, à une échelle de temps plus grande, c'est-à-dire, à l'échelle de décennies (classes d'âge 0-20; 21-40 et 41-60 ans) (Biget *et al. in prep*). Nos résultats préliminaires suggèrent que l'âge impacte significativement la composition bactérienne des pieds de vigne mais semble ne pas avoir d'effet sur la structuration des communautés fongiques. De plus, nous montrons, par l'analyse de réseaux de co-occurrences, une plus forte complexité et robustesse des réseaux d'interactions entre bactéries et champignons chez les pieds de vigne âgés, ce qui semble suggérer une plus grande stabilité des vieilles vignes face à des pressions biotiques et abiotiques (Biget *et al. in prep*). Cette thèse met donc en avant l'importance de comprendre finement les variations temporelles auxquelles est soumis le microbiote de la vigne au cours de sa vie, entre deux années et au cours d'une seule année afin de mieux appréhender et gérer de potentiels stress environnementaux aux champs.

## Discussion générale

L'étude des facteurs déterminants de l'assemblage des communautés bactériennes et fongiques démontre un fort impact des facteurs environnementaux locaux et révèle une nouvelle dimension du profil spatial des communautés microbiennes dans un vignoble pourtant très homogène en termes de roche mère et de type de sol (échelle géographique plus petite). Ce travail est essentiel car il supporte l'importance d'inclure dans les études du *terroir microbiologique* de la vigne, un grand nombre de variables afin de jauger au mieux le poids de chacun des facteurs sur les assemblages microbiens. De plus, notre analyse de la dynamique temporelle du microbiote, démontre les relations étroites entre assemblages microbiens, phénologie (stade de développement des plantes) et leur adaptation aux conditions environnementales ainsi que l'âge effectif de la vigne. Le nombre croissant de preuves empiriques en faveur d'un recrutement déterminé de microorganismes selon des pressions multiples et complexes, environnementales, plantes-dépendantes et temporelles démontre bien l'importance de mieux comprendre les mécanismes associés au microbiote des plantes.

Afin de mieux comprendre les règles d'assemblage du microbiote des plantes et d'étayer les connaissances fondamentales en écologie végétale et microbienne, il serait intéressant d'étudier les microorganismes du sol et du sol rhizosphérique, afin de faire le parallèle avec la fraction effectivement recrutée par la plante et présente dans l'endosphère racinaire (fraction étudiée dans cette thèse). En effet, la majorité des études travaille sur le sol, voire le sol rhizosphérique, et montre une diminution de la diversité et une augmentation de la spécialisation du pool microbien du sol vers l'endosphère racinaire. Cette analyse permettrait de mieux définir les mécanismes de colonisation et de sélection de certains taxa par la plante hôte et de s'approcher au plus proche du "véritable" *terroir microbiologique* associé à une parcelle ou un domaine, si l'on se place dans une vision "holobionte" de la vigne (la plante et son cortège de microorganismes symbiotiques).

### C. Définir le *terroir microbiologique* et sa mobilisation pour la gestion de la vigne

Les recherches menées dans cette thèse apportent de nouvelles preuves empiriques de la validité du concept de l'holobionte et de l'effet des facteurs environnementaux, du temps et des pratiques sur l'assemblage des communautés microbiennes associées à cet holobionte. Cependant, plusieurs questions et liens entre assemblages et fonctions écologiques restent en suspens. La définition fine du *terroir microbiologique*, dans une vision "holobionte" et à l'échelle du vignoble, doit permettre la mise en place d'outils de gestion particuliers et promouvoir des stratégies adéquates face aux changements globaux.

## I. Mieux décrire le terroir microbiologique

Nos recherches ont montré un recrutement préférentiel de certains taxa, l'existence d'une variabilité spatiale et temporelle et un effet de certaines pratiques dans la structuration des communautés microbiennes majoritairement à l'échelle du phylum. Afin de renforcer nos conclusions, il serait intéressant d'ajouter une composante quantitative à ces études. En effet, les données de séquençage d'amplicons contiennent une information sur l'abondance relative de chaque cluster de séquences ("espèces"). Si l'abondance relative d'un cluster de séquences est élevée, c'est-à-dire en forte proportion, cela ne signifie pas nécessairement qu'il est abondant dans l'échantillon analysé. Il serait donc intéressant de compléter ces analyses par des travaux de quantification (PCR quantitative) (Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2021) via l'utilisation de gammes de standards de gènes 16S ou 18S ou par l'analyse de cellules uniques (*single cell sequencing*). Une autre technique possible pour quantifier la présence de telle ou telle "espèce" pourrait être l'ajout d'un échantillon "standard" de bactéries ou de champignons dans le pool de séquençage pour lequel, le nombre de copies de microorganismes est connu. Ainsi, il serait possible de faire le lien entre nombre de séquences obtenues pour cet échantillon standard après séquençage et quantité de cellules microbiennes présentes à l'origine et d'en déduire la valeur pour nos échantillons inconnus.

Concernant la résolution taxonomique, ces études gagneraient en puissance via l'utilisation d'une résolution taxonomique plus élevée (jusqu'à l'espèce) et en évitant les biais potentiels introduits par les PCRs lors de la production d'amplicons (Zinger *et al.* 2019; Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2021). Pour ce faire, une des prochaines étapes de cette thèse pourrait être l'étude de la diversité microbienne par métagénomique (séquençage shotgun) ou par l'utilisation de la technique du séquençage de longs fragments (long read sequencing), spécialement utile en génomique environnementale, discipline travaillant sur des échantillons souvent très complexes (Tedersoo *et al.* 2021). Toutefois, il faut bien prendre en compte que, en plus des procédures de biologie moléculaire, le type de pipeline d'analyses bioinformatiques utilisé pour gérer les données brutes de séquençage a un fort impact sur les espèces révélées par les jeux de données (Pauvert *et al.* 2019). Grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire et à des outils bioinformatiques adéquats, il serait possible de préciser les espèces spécifiquement recrutées par la plante (reconstruction de génomes rendue possible) pour faire face à des stress biotiques ou abiotiques précis et de connaître les spécificités génétiques et fonctionnelles de ces microorganismes clés pour la plante.

Enfin, il me semble inévitable de nos jours, de faire le lien entre les différentes analyses de génomique, transcriptomique et de protéomique ("*multi-omics*"). Un des enjeux majeurs de l'écologie microbienne est, outre une description des communautés microbiennes présentes à un instant donné, la compréhension fine des fonctions que ces microorganismes fournissent aux plantes.

## II. Améliorer les connaissances : combiner conditions contrôlées et suivis en plein champ

L'une des forces de cette thèse est le plan d'échantillonnage ambitieux mené *in situ*, en plein champ grâce à la collaboration des partenaires des vignobles et de la pépinière viticole. Cependant, cette thèse questionne un point important quant à l'analyse fine des mécanismes de régulation des communautés microbiennes. Faut-il privilégier le travail en conditions contrôlées (p.ex. parcelle expérimentale dédiée et uniformité des plantes, chambre de culture pour la croissance de plantes) et s'assurer de la standardisation de plusieurs paramètres afin de se concentrer sur les effets de certaines variables spécifiques? ou faut-il amener les recherches en écologie microbienne à augmenter les études en plein champ afin de mieux rendre compte de la grande diversité et complexité du monde microbien. Cette question n'est en aucun cas manichéenne. Ces deux types d'analyses ont leurs avantages et leurs inconvénients et sont bien souvent complémentaires.

Pour étudier un mécanisme particulier, la réduction de la complexité d'un système biologique peut permettre de mettre en lumière des facteurs essentiels à la structuration des communautés. Par exemple, dans la recherche d'une meilleure compréhension des mécanismes de colonisation/recrutement des microorganismes par la plante et afin de déterminer les effets de dilution de la diversité au profit de la spécialisation du microbiote du sol vers l'endosphère, il peut s'avérer précieux, dans l'énoncé de conclusions fondamentales, de pouvoir contrôler certains paramètres clés impliqués dans la structuration du microbiote (p.ex. lumière, humidité, type de sol). Un autre exemple, dans le cas de la vigne, est le génotype des plantes et des porte-greffes étudiés. On sait, et on l'a démontré au cours de cette thèse, que le porte-greffe est un facteur déterminant dans l'assemblage des communautés microbiennes. Ce facteur reste difficilement contrôlable *in situ* (domaine viticole) du fait des remplacements progressifs (complantations) des pieds de vigne morts et du manque de traçabilité de chaque pied. Le fait de pouvoir contrôler l'uniformité du génotype des porte-greffes au sein de parcelles expérimentales dédiées ou en chambre de culture pourrait permettre d'asseoir les conclusions liées à la dynamique spatiale et temporelle du *terroir microbiologique* mais également, de mieux comprendre les mécanismes régulateurs de la vigne en tant que holobionte (par exemple, molécules signales, évolution et coévolution).

Cependant, l'utilisation de conditions contrôlées et de chambres de croissance, même si elles sont pratiques, ne reflètent pas la réalité des interactions biologiques, la complexité des mécanismes associés et des liens qui existent entre microorganismes, plantes, humains et conditions biotiques et abiotiques dans la nature. Le cas de l'étude du *terroir microbiologique* de la vigne est un exemple criant de cette complexité et de l'importance du travail de recherche en plein champ. En effet, le lien entre les patrons biogéographiques microbiens, à grandes et petites échelles géographiques, et les spécificités d'un vin sont maintenant bien documentés dans la littérature (revue complète de la littérature de Liu *et*



al. 2019). Ces études mettent d'ailleurs en avant la complexité du *terroir* et du *terroir microbiologique* comme signature d'un vin ou du moins, d'une région viticole. Il semble donc impossible, ou du moins incomplet, de vouloir étudier le *terroir microbiologique* et l'assemblage de ces communautés microbiennes sans y inclure l'ensemble des paramètres biotiques, abiotiques de l'endroit analysé (variables multiples d'un écosystème) et les caractéristiques du produit fini. Cependant, dans ce genre d'études multi-factorielles, il est indispensable de bien penser le plan d'échantillonnage en amont et de réfléchir aux méthodes d'analyses statistiques utilisées en écologie microbienne, pour pouvoir tester l'effet de chaque variable sur la structuration des communautés de microorganismes. De par cette réflexion essentielle en amont, les analyses en plein champ peuvent être révélatrices des dynamiques et interactions complexes qui ont lieu entre la plante et son microbiote et permettre une meilleure appréhension de ce *terroir microbien* à l'échelle d'un domaine. Cette amélioration des connaissances au sein du vignoble doit *in fine* servir les acteurs de terrain dans leur travail quotidien à la vigne.

### III. Lien avec les performances de la vigne

Nos recherches suggèrent que la composante microbienne est indissociable de la définition du *terroir* de la vigne. Cependant, afin de corréliser nos observations à la définition du *terroir microbiologique* de la vigne, l'analyse de composés aromatiques ou de métabolites secondaires devra être incorporée aux prochaines études (Belda *et al.* 2021). Pour renforcer notre étude, il serait également important de mesurer des marqueurs de performances de la vigne afin de pouvoir faire le lien entre variabilité de composition, de richesse et/ou diversité en espèces indicatrices et traits spécifiques de la plante (p.ex. décalage dans les stades phénologiques clés de la vigne). Ces améliorations du plan d'expérience doivent permettre aux acteurs de terrain de pouvoir faire le lien entre nos résultats fondamentaux et leurs observations et savoirs empiriques sur la vigne. Dans une des expériences pilotes de l'axe 2 (impact des pratiques), dans laquelle nous avons cherché à connaître l'effet du type d'enherbement sur le microbiote de la vigne, nous avons mis en place un suivi de la phénologie de la vigne qui devait être réalisé par le personnel du vignoble. Cependant, ces observations, en plus du travail à la vigne des personnes impliquées, n'a pas pu être réalisée sur la durée totale de l'expérience du fait de la charge de travail colossale que représente le suivi phénologique de cette expérience. Il est donc impératif que ce suivi ainsi que les analyses physico-chimiques des molécules du vin soient réalisés par les chercheurs, en association avec les acteurs de terrain. Grâce à une meilleure compréhension des contributions de la composante microbienne aux caractéristiques du vin et aux performances de la plante, le travail à la vigne et la production du vin pourraient être optimisés par des pratiques humaines réfléchies en faveur d'une viticulture plus douce, que prône le domaine partenaire, pour *in fine*, sublimer toute l'expression d'un *terroir* particulier dans le produit fini.

Par ailleurs, dans un souci de maintien des cultures, l'étude du *terroir microbiologique* et son hétérogénéité au sein même d'un domaine peut être couplée à l'analyse de la résistance des vignes

(p.ex. résistances à des maladies). En effet, il semble important de pouvoir corrélérer des observations *in situ* (cépage plus résistant au mildiou par exemple) à une analyse profonde du microbiote de la plante. Dans l'étude des dysbioses, on observe souvent des modifications de la composition des communautés microbiennes entre les organismes "sains" et "malades" corrélées à l'expansion des agents pathogènes (Erlacher *et al.* 2014; Rocca *et al.* 2019; Lee *et al.* 2021). Une question encore peu comprise est la suivante : les modifications du microbiote que l'on observe sont-elles une cause ou une conséquence d'un pathogène? Il semble donc vraiment important de pouvoir lier un phénotype ou même un génotype (entendons dans notre exemple, un cépage), un type de pratique (enherbement spécifique de certaines parcelles résistantes par exemple), ou un paysage particulier à une communauté de microorganismes donnée afin de mieux comprendre l'origine d'une maladie et pouvoir gérer en amont l'expression d'une maladie donnée. Cependant, il est important de comprendre, et ce pour une gestion durable des vignes, que la résistance des plantes à certains pathogènes ou au dépérissement, n'est pas due à un seul paramètre, mais plutôt à l'interaction de plusieurs variables influençant l'holobionte, lui-même étant un élément au sein d'un écosystème plus complexe. Des observations récentes ont montré que l'enrichissement des microorganismes protecteurs au sein de la rhizosphère est associé au développement de "sols suppresseurs de maladies" (sols dans lesquels un agent pathogène ne s'établit pas ou ne persiste pas, et s'il s'établit, il ne cause que peu ou pas de dommages), dans lesquels les plantes ne présentent aucun symptôme même en présence d'agents pathogènes (Teixeira *et al.* 2019).

#### IV. Le terroir microbiologique pour la gestion de la vigne

##### a. Gérer la vigne comme un holobionte

Avec l'acceptation grandissante du concept d'holobionte, du moins dans sa définition générale (la plante associée à ses symbiotes), la vision des plantes et leur gestion évoluent. De plus en plus de scientifiques et d'acteurs de terrain prônent une approche holistique et reviennent aux pratiques fondamentales trop longtemps sous-estimées au profit de la sélection variétale basée sur la génétique végétale. L'équilibre des relations entre plantes et microorganismes dans un environnement donné a de nombreuses implications sur le développement et l'adaptation des plantes (phénotype et *fitness* de la plante) (Vandenkoornhuyse *et al.* 2015), et questionne donc plusieurs types de gestion mis en place à la vigne.

L'application de fongicides et de pesticides, dans des systèmes dits "conventionnels", ou encore, la pulvérisation d'agents de biocontrôle, dans des systèmes plus "durables" affectent le microbiote des sols du vignoble, et de ce fait, impactent directement la stabilité de l'holobionte. Pourtant, comme expliqué plus haut (C-III de la discussion générale), l'expression d'un pathogène n'est pas seulement dépendante de sa présence ou non dans un environnement donné. En effet, la modification de l'écosystème peut également être le déclencheur de l'expression de la maladie. Ainsi, il est important de comprendre en quoi, l'application de différents composés/solutions exogènes, même d'origine

## Discussion générale

biologique, peut dérégler l'équilibre de l'holobionte dans l'interaction plantes-symbiotes et pathogènes et favoriser l'expression de ces derniers. Par ailleurs, si l'on considère l'enherbement des inter-rangs, pratique largement utilisée en viticulture, sous l'angle de l'holobionte, il est important de questionner les espèces d'adventices choisies si l'enherbement n'est pas naturel. Comme expliqué plus haut (B-I-c de la discussion générale), les espèces voisines ont un impact sur le réservoir de microorganismes recrutables par la vigne. L'addition ou l'enrichissement d'espèces microbiennes exogènes, via l'enherbement, peut donc également modifier l'équilibre de l'holobionte et créer des compétitions entre espèces colonisatrices au détriment d'espèces fonctionnelles et normalement recrutées par la plante hôte. Bien qu'une plus grande diversité biologique favorise à la fois la santé des sols, des plantes et des écosystèmes, il reste important de penser la vigne comme une unité fonctionnelle adaptée à des conditions abiotiques et biotiques particulières et promouvoir la croissance d'adventices naturelles, déjà présentes sur une parcelle et donc en interaction étroite avec les communautés microbiennes indigènes.

Le greffage de la vigne, pratique majoritaire dans les cultures de vigne, peut également être regardée sous l'angle "holobionte". En marge du chapitre 2, nous avons regardé si l'action mécanique du greffage avait un impact sur la composition du microbiote des vignes (données non incluses dans cette thèse). On montre que le simple fait de "couper" un jeune pied de vigne et de greffer les deux parties disjointes a un effet significatif sur la composition des communautés microbiennes (en comparaison du contrôle non greffé). Il est donc essentiel de repenser la production des jeunes pieds de vigne, qui en plus d'être issus de greffage, sont généralement dérivés de clones sélectionnés. En ayant une action mécanique sur une entité fonctionnelle, et en sélectionnant des clones, il est possible de générer des dysfonctionnements dans un cortège microbien déjà établi, ou ayant coévolué avec son hôte. Nous montrons également que l'origine du greffon a un effet significatif sur la structure de la communauté. Comme le microbiote recruté par la plante dépend du réservoir disponible dans le sol à un endroit donné, il semble également important de privilégier des greffons de vigne déjà implantés au domaine et ce, dans l'optique de favoriser l'holobionte (voir la sélection massale C-IV-c de la discussion générale). Associé à cette question, il est également très important de comprendre à quel degré la culture en pépinière des jeunes pieds de vigne (réservoir de microorganismes propres) influe le microbiote de ces jeunes vignes, et impacte, de ce fait, le microbiote futur de la plante et l'adaptabilité de l'holobionte dans un domaine viticole donné (réservoir de microorganismes distincts de la pépinière).

Enfin, dans une optique de meilleure gestion de l'holobionte et de traçabilité des pieds de vigne au domaine, il est également envisageable de mieux définir les conditions de complantation (remplacement des pieds de vigne morts, pratique largement utilisée dans les vignobles) en analysant le type de *terroir microbiologique* d'une parcelle donnée. Par exemple, après une analyse détaillée des porte-greffes qui évoluent favorablement dans un *terroir microbien* donné (relation holobionte et

environnement), il sera possible de sélectionner spécifiquement un type de porte-greffe pour une parcelle et de ce fait, éviter son déclin précoce et favoriser l'adaptabilité des pieds.

### **b. Des nouveaux outils pour le diagnostic du *terroir microbiologique* et les actions de gestion**

Avec l'étude fine du microbiote de la vigne, de nouveaux outils de diagnostic du *terroir microbiologique* peuvent être pensés et implémentés dans les vignobles. Par exemple, la cartographie du *terroir microbiologique* à l'échelle d'un domaine peut permettre de considérer d'une part la stabilité/hétérogénéité dans le temps et dans l'espace du microbiote de la vigne et de corrélérer des parcelles spécifiques (utilisation pour le grand vin ou le second vin d'un domaine) à des patrons particuliers de communautés microbiennes. Grâce aux nombreux outils d'analyse physico-chimique déjà en place dans les domaines et des données propres à la vigne, il est possible de superposer plusieurs niveaux d'informations (métadonnées) et d'en tirer des tendances quant aux trajectoires de viticultures à favoriser. Ainsi, les informations liées aux propriétés du sol (pH, contenu en azote, en matière organique, statut hydrique), à la vigne (âge, cépages, porte-greffe), aux pratiques (type d'enherbement, fréquence de retournement du couvert végétal, pulvérisation de cuivre) et aux particularités du produit fini doivent permettre de mieux comprendre les patrons d'hétérogénéité observés à l'échelle microscopique (facteurs qui influencent le microbiote) et inversement (microbiote particulier qui impacte les propriétés des baies et du vin). De plus, avec la représentation et l'extrapolation du microbiote sur une carte géographique, il semble possible et particulièrement adéquat dans un contexte de biogéographie des microorganismes, d'approcher l'analyse des patrons d'hétérogénéité microbienne par le corpus du paysage microbien (Mony *et al.* 2020a).

Grâce à l'étude des microorganismes associés à la vigne, il est également possible de proposer des outils pour la restauration de la qualité du *terroir microbiologique*, si cela s'avère nécessaire. De nombreux programmes de recherche pour la sauvegarde des vignobles voient le jour dans le but de freiner le déclin de ces cultures ("*dépérissement du bois*"). Comprendre si ce déclin est lié à des modifications ou à un déséquilibre du microbiote doit permettre de mettre en évidence certains microorganismes clés impliqués dans une dysbiose/maladie précise et doit conduire à la recherche de solutions, à court ou moyen termes, faisant appel à la bio-ingénierie (Bettenfeld *et al.* 2020). Il est alors envisageable d'inoculer, en champ ou à la pépinière, certains microorganismes (sous forme d'un cocktail) dont les fonctions écologiques (p.ex. nutrition minérale et hydrique, stimulation du système immunitaire de la plante, capacité antimicrobienne) sont nécessaires à la vigne. Il est également imaginable de sélectionner les spores de champignons mycorrhiziens retrouvés dans un *terroir microbiologique* spécifique et favorable au maintien des cultures, et de réintroduire ces champignons dans le sol d'autres parcelles. En tant qu'écologues spécialisés dans la microbiologie, c'est l'interprétation que nous faisons des solutions de biodynamie pulvérisées (c'est-à-dire, l'inoculation de

cocktails de microorganismes via la solution 500 principalement). En effet, le fait d'enterrer durant 6 mois de la matière organique (bouse de vache contenue dans une corne) dans le sol favorise l'enrichissement de nombreux microorganismes au sein de cette corne. La pulvérisation de ces solutions, diluées et dynamisées, augmente la diversité des microorganismes disponibles dans le réservoir microbien dans lequel va puiser la plante. L'utilisation de "cocktails microbiens" doit cependant être réalisée avec certaines précautions et après des études de preuves de concept spécifique au domaine en conditions standardisées (réduction de la complexité biologique). Elle doit surtout prendre en compte le *terroir microbiologique* propre du domaine ou de la parcelle cible (utilisation des cartographies proposées ci-dessus par exemple) afin d'éviter l'ajout de microorganismes exogènes compétiteurs et l'aggravation de la situation par le déséquilibre de la balance de l'holobionte et de l'écosystème dans lequel il évolue.

### c. Le terroir microbiologique face aux changements globaux

Un point crucial des recherches scientifiques est de pouvoir lier les découvertes fondamentales à la pratique afin de gérer au mieux les changements alarmants à venir. Le changement climatique, causé par l'activité humaine, aura des conséquences profondes sur la vigne (plante pérenne) et sur son microbiote, affectant ainsi la santé des cultures, la qualité et la singularité d'un vin. Dans cette thèse, nous montrons un lien étroit entre hétérogénéité spatiale, dynamique temporelle, pratiques et assemblage du microbiote. Les modifications dûes aux changements globaux causeront inévitablement des modifications des propriétés du sol, l'accroissement des écarts de température et l'augmentation des aléas climatiques (événements extrêmes de type gel, grêle) ce qui modifiera très certainement le *terroir microbiologique* de la vigne.

Derrière ces recherches fondamentales, plusieurs actions peuvent être mises en place dans le domaine, afin de favoriser la diversité des plantes et des microorganismes et tenter de pallier le déclin des vignobles et des cultures en général. Apporter de la diversité est en effet un des moteurs fondamentaux de résistance/résilience des écosystèmes (Loreau 2001). Plusieurs pistes peuvent être envisagées concernant l'inclusion de diversité au sein de domaines viticoles, souvent très homogènes. Cela questionne par exemple l'utilisation de clones (greffons et porte-greffes, qui plus est, d'origine exogènes et ne possédant pas le microbiote associé au terroir) dans la production de vignes. C'est tout l'enjeu de la sélection massale (sélection de populations) que de nombreux domaines expérimentent. La sélection massale s'opère généralement à partir de vieilles vignes (non identifiées en clones), considérées "saines" et robustes et âgées de plus de 40 ans. A partir de ces plants, des bourgeons sont taillés et "insérés" (taille biseautée du tronc pour y loger le bourgeon) dans des plants de vigne (porte-greffe) déjà en place sur une parcelle. Cette méthode (utilisée avant l'arrivée du clonage) doit permettre aux domaines de sélectionner des pieds donateurs présentant une diversité avantageuse. Il existe encore beaucoup de réticence à la sélection massale du fait du risque sanitaire (p.ex. propagation de viroses au

## *Discussion générale*

domaine). Cependant, la sélection massale pourrait permettre une augmentation de diversité génétique importante pour la santé des écosystèmes. Elle pourra également permettre de sélectionner des plants à maturité plus lente au domaine voire possédant un cycle plus précoce (dès le débourrement), pour contrebalancer les conséquences du réchauffement climatique (p.ex. précocité des vendanges). Une autre pratique visant à améliorer la diversité au sein de l'écosystème viticole, au-delà de l'utilisation d'enherbements, est le développement de l'agroforesterie. Cette technique visant à implanter durablement des arbres, haies, bordures au sein des vignobles, permettrait d'augmenter la diversité globale et de créer des microclimats pouvant tamponner les changements globaux (p.ex. revue de la littérature de Paiola *et al.* 2020). Augmenter les savoirs sur la dynamique temporelle du microbiote et sa réponse aux stress environnementaux doit également faire l'objet de recherches approfondies, afin de pouvoir "modifier", si besoin, le réservoir microbien au champ selon les stress occasionnés par le dérèglement climatique. Ces quelques exemples de liens entre *terroir microbiologique* et pratique pourraient aider, dans le futur, l'industrie viticole et la culture végétale en général à s'armer face aux changements climatiques.

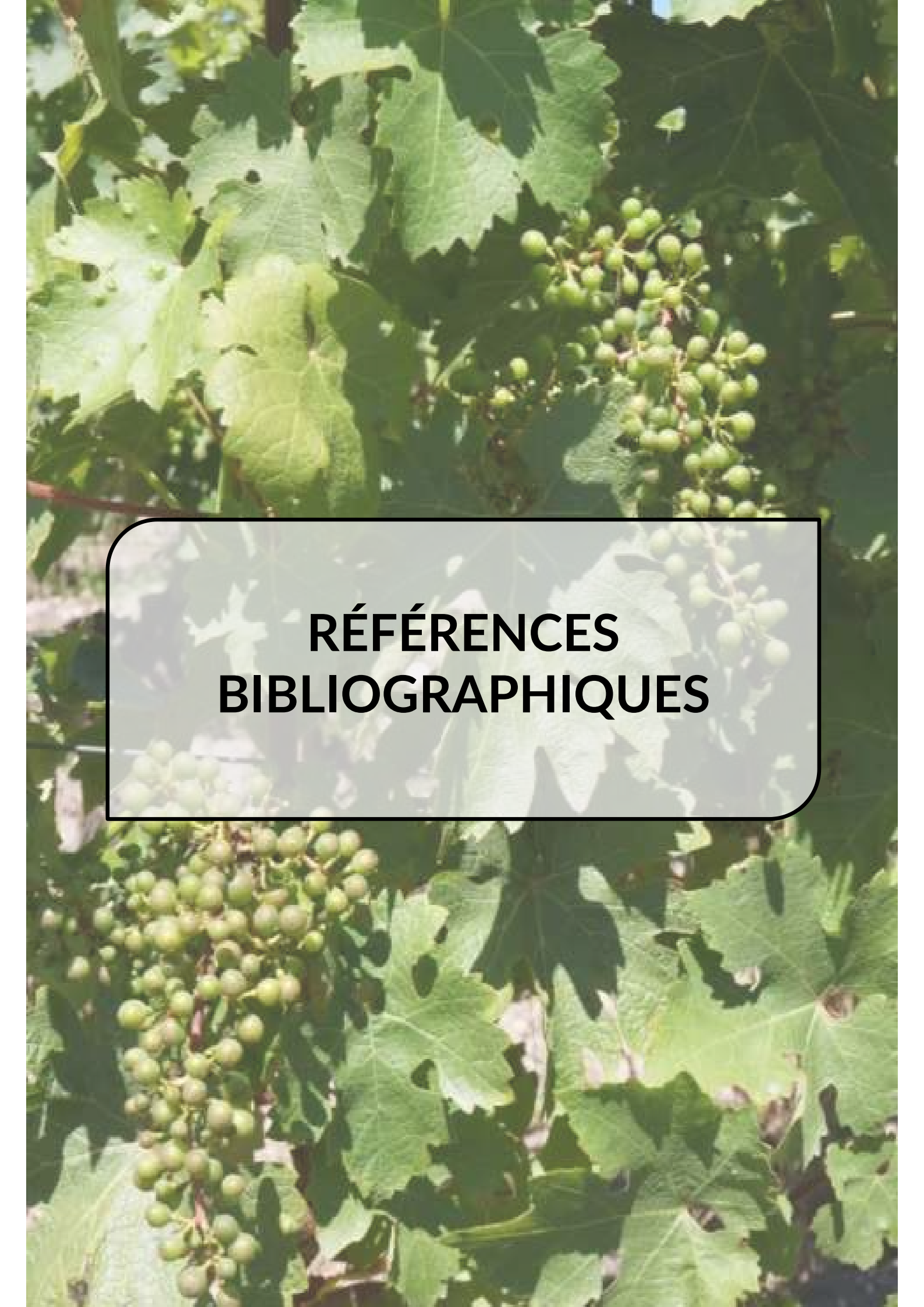


### *Pour conclure ...*

La recherche présentée dans cette thèse aborde des concepts clés tant sur le plan fondamental que appliqué et apporte un ensemble de connaissances pour le domaine de l'écologie microbienne et pour les savoirs empiriques associés à la conduite des cultures végétales. Cette thèse propose une avancée significative dans notre perception de l'individualité, celle de repenser une entité fonctionnelle comme la somme de l'ensemble des composantes qui la constitue (l'holobionte et l'hologénome). Une nouvelle révolution "copernicienne" semble s'initier avec un changement de la vision anthropo- et plante centrée, au profit d'une vision holobionte centrée, une vision holistique... Cette thèse contribue également à améliorer les connaissances et la compréhension des mécanismes qui régissent les assemblages microbiens au sein de cet holobionte. Elle démontre un fort effet des conditions locales environnementales sur la structuration des communautés à l'échelle d'une aire géographique restreinte ainsi que l'existence de pressions temporelles déterminées sur les assemblages microbiens associées à des stades phénologiques capitaux de la plante. Cette thèse repousse ainsi les limites de la définition du *terroir microbiologique* de la vigne à l'échelle d'un domaine viticole et révèle l'importance de l'écologie microbienne dans la pratique au vignoble. Cette thèse n'est que la première étape d'une longue série de recherches et d'expériences qui seront mises en place entre les acteurs académiques et les partenaires privés afin d'améliorer la compréhension des interactions complexes entre les environnements, les plantes et les microorganismes. L'ensemble des connaissances doit fournir *in fine* des perspectives plus complètes pour restaurer la biodiversité et le fonctionnement d'une viticulture et plus généralement, d'une agriculture durable dans un contexte de changement climatique.







**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références Bibliographiques

- Al-Karaki GN. Nursery inoculation of tomato with arbuscular Al-Karaki GN. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Sci Hort* 2006;**109**:1–7.
- Altieri MA, Nicholls CI. The simplification of traditional vineyard based agroforests in northwestern Portugal: some ecological implications. *Agroforestry Systems* 56: 185–191, 2002. © Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Archie EA, Tung J. Social behavior and the microbiome. *Curr Opin Behav Sci* 2015;**6**:28–34.
- Aseel DG, Rashad YM, Hammad SM. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Trigger Transcriptional Expression of Flavonoid and Chlorogenic Acid Biosynthetic Pathways Genes in Tomato against Tomato Mosaic Virus. *Sci Rep* 2019;**9**:9692.
- Augé RM, Toler HD, Saxton AM. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 2015;**25**:13-24.
- Averill C, Bhatnagar JM, Dietze MC *et al.* Global imprint of mycorrhizal fungi on whole-plant nutrient economics. *Proc Natl Acad Sci* 2019;**116**:23163–8.
- Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Front Plant Sci* 2018;**9**:1473.
- Badri DV, Vivanco JM. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 2009;**32**:666–81.
- Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK *et al.* Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* 2018;**560**:233–7.
- Bakhshandeh E, Gholamhosseini M, Yaghoobian Y *et al.* Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. *Plant Growth Regul* 2020;**90**:123–36.
- Baltrus DA. Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes. *Curr Opin Plant Biol* 2017;**38**:109–16.
- Banerjee A, Duflo E, Postel-Vinay G *et al.* Long-Run Health Impacts of Income Shocks: Wine and Phylloxera in Nineteenth-Century France. *Rev Econ Stat* 2010;**92**:714–28.
- Banerjee S, Walder F, Büchi L *et al.* Agricultural intensification reduces microbial network complexity and the abundance of keystone taxa in roots. *ISME J* 2019;**13**:1722–36.
- Baptiste E, Gérard P, Larose C *et al.* The Epistemic Revolution Induced by Microbiome Studies: An Interdisciplinary View. *Biology* 2021;**10**:651.
- Barham E. Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. *J Rural Stud* 2003;**19**:127–38.
- Begum N, Qin C, Ahanger MA *et al.* Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front Plant Sci* 2019;**10**:1068.
- Belda I, Gobbi A, Ruiz J *et al.* Microbiomics to Define Wine Terroir. *Comprehensive Foodomics*. Elsevier, 2021, 438–51.
- Belda I, Zarraindia I, Perisin M *et al.* From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. *Front Microbiol* 2017;**8**:821.
- Belew D, Astatkie T, Mokashi MN *et al.* Effects of Salinity and Mycorrhizal Inoculation (*Glomus fasciculatum*) on Growth Responses of Grape Rootstocks (*Vitis* spp.). *South Afr J Enol Vitic* 2016;**31**, DOI: 10.21548/31-2-1404.
- Belmonte SA, Celi L, Stahel RJ *et al.* Effect of Long-Term Soil Management on the Mutual Interaction Among Soil Organic Matter, Microbial Activity and Aggregate Stability in a Vineyard. *Pedosphere* 2018;**28**:288–98.
- Bennett AE, Daniell TJ, Öpik M *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Fungal Networks Vary throughout the Growing Season and between Successional Stages. Bruun HH (ed.). *PLoS ONE* 2013;**8**:e83241.

## Références Bibliographiques

- Benton TG, Vickery JA, Wilson JD. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends Ecol Evol* 2003;**18**:182–8.
- Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: Plant species, soil type and rhizosphere communities. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;**68**:1–13.
- Berlanas C, Berbegal M, Elena G *et al.* The Fungal and Bacterial Rhizosphere Microbiome Associated With Grapevine Rootstock Genotypes in Mature and Young Vineyards. *Front Microbiol* 2019;**10**:1142.
- Bettenfeld P, Fontaine F, Trouvelot S *et al.* Woody Plant Declines. What’s Wrong with the Microbiome? *Trends Plant Sci* 2020;**25**:381–94.
- Bittebiere A, Vandenkoornhuyse P, Maluenda E *et al.* Past spatial structure of plant communities determines arbuscular mycorrhizal fungal community assembly. Singh B (ed.). *J Ecol* 2020;**108**:546–60.
- Blanton LV, Charbonneau MR, Salih T *et al.* Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science* 2016;**351**:aad3311–aad3311.
- Bodenhausen N, Somerville V, Desirò A *et al.* Petunia- and Arabidopsis-Specific Root Microbiota Responses to Phosphate Supplementation. *Phytobiomes J* 2019;**3**:112–24.
- Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM *et al.* PNAS Plus: From the Cover: Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:E139–48.
- Boon E, Meehan CJ, Whidden C *et al.* Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. *FEMS Microbiol Rev* 2014;**38**:90–118.
- Bordenstein SR, Theis KR. Host Biology in Light of the Microbiome: Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. Waldor MK (ed.). *PLOS Biol* 2015;**13**:e1002226.
- Bright M, Bulgheresi S. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:218–30.
- Buée M, Reich M, Murat C *et al.* 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol* 2009;**184**:449–56.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K *et al.* Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 2012;**488**:91–5.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S *et al.* Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu Rev Plant Biol* 2013;**64**:807–38.
- Burns KN, Bokulich NA, Cantu D *et al.* Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by vineyard management. *Soil Biol Biochem* 2016;**103**:337–48.
- Burns KN, Kluepfel DA, Strauss SL *et al.* Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biol Biochem* 2015;**91**:232–47.
- Cairney JWG. Ectomycorrhizal fungi: the symbiotic route to the root for phosphorus in forest soils. *Plant Soil* 2011;**344**:51–71.
- Calderón FJ, Jackson LE, Scow KM *et al.* Short-Term Dynamics of Nitrogen, Microbial Activity, and Phospholipid Fatty Acids after Tillage. *Soil Sci Soc Am J* 2001;**65**:118–26.
- Calleja-Cervantes ME, Fernández-González AJ, Irigoyen I *et al.* Thirteen years of continued application of composted organic wastes in a vineyard modify soil quality characteristics. *Soil Biol Biochem* 2015;**90**:241–54.
- Cameron DD, Neal AL, van Wees SCM *et al.* Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci* 2013;**18**:539–45.
- Canfora L, Vendramin E, Felici B *et al.* Vineyard microbiome variations during different fertilisation practices revealed by 16s rRNA gene sequencing. *Appl Soil Ecol* 2018;**125**:71–80.

## Références Bibliographiques

- Caplat Jacques – L'agriculture biologique pour nourrir l'humanité (Actes Sud, 2012).
- Caplat Jacques – Changeons d'agriculture – Réussir la transition (Actes Sud, 2014).
- Castañeda LE, Miura T, Sánchez R *et al.* Effects of agricultural management on phyllosphere fungal diversity in vineyards and the association with adjacent native forests. *PeerJ* 2018;**6**:e5715.
- Cha J-Y, Han S, Hong H-J *et al.* Microbial and biochemical basis of a Fusarium wilt-suppressive soil. *ISME J* 2016;**10**:119–29.
- Chable V, Serpolay E. A multi - actors and transdisciplinary research for organic and local food systems. *Techniques de l'Ingénieur AG 103* (10 janvier 2016).
- Chang CC, Turner BL. Ecological succession in a changing world. Bardgett R (ed.). *J Ecol* 2019;**107**:503–9.
- Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J* 2014;**8**:790–803.
- Chareesri A, De Deyn GB, Sergeeva L *et al.* Increased arbuscular mycorrhizal fungal colonization reduces yield loss of rice (*Oryza sativa* L.) under drought. *Mycorrhiza* 2020;**30**:315–28.
- Chesneau G, Torres-Cortes G, Briand M *et al.* Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiol Ecol* 2020;**96**:fiae190.
- Cho K, Toler H, Lee J *et al.* Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *J Plant Physiol* 2006;**163**:517–28.
- Chou M-Y, Vanden Heuvel J, Bell TH *et al.* Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Sci Rep* 2018;**8**:11039.
- Christie P, Li X, Chen B. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant Soil* 2004;**261**:209–17.
- Cleveland CC, Liptzin D. C:N:P stoichiometry in soil: is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? *Biogeochemistry* 2007;**85**:235–52.
- Cloutier ML, Murrell E, Barbercheck M *et al.* Fungal community shifts in soils with varied cover crop treatments and edaphic properties. *Sci Rep* 2020;**10**:6198.
- Compant S, Cambon MC, Vacher C *et al.* The plant endosphere world – bacterial life within plants. *Environ Microbiol* 2021;**23**:1812–29.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem* 2010;**42**:669–78.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG *et al.* Endophytes of Grapevine Flowers, Berries, and Seeds: Identification of Cultivable Bacteria, Comparison with Other Plant Parts, and Visualization of Niches of Colonization. *Microb Ecol* 2011;**62**:188–97.
- Compant S, Samad A, Faist H *et al.* A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res* 2019;**19**:29–37.
- Coombe B. Research on development and ripening of the grape berry. *Am J Enol Vitic* 1992;**43**:101-110.
- Copeland JK, Yuan L, Layeghifard M *et al.* Seasonal Community Succession of the Phyllosphere Microbiome. *Mol Plant-Microbe Interactions*® 2015;**28**:274–85.
- Courty P-E, Buée M, Diedhiou AG *et al.* The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biol Biochem* 2010;**42**:679–98.
- Cravero MC. Organic and biodynamic wines quality and characteristics: A review. *Food Chem* 2019;**295**:334–40.
- D'Amico F, Candela M, Turrone S *et al.* The Rootstock Regulates Microbiome Diversity in Root and Rhizosphere Compartments of *Vitis vinifera* Cultivar Lambrusco. *Front Microbiol* 2018;**9**:2240.

## Références Bibliographiques

- Dangl JL, Jones JDG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 2001;**411**:826–33.
- Delaux P-M, Schornack S. Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science* 2021;**371**:eaba6605.
- Deyett E, Rolshausen PE. Temporal Dynamics of the Sap Microbiome of Grapevine Under High Pierce's Disease Pressure. *Front Plant Sci* 2019;**10**:1246.
- Di Giacinto S, Friedel M, Poll C *et al.* Vineyard management system affects soil microbiological properties. *OENO One* 2020;**54**, DOI: 10.20870/oeno-one.2020.54.1.2578.
- Douglas AE, Werren JH. Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. McFall-Ngai MJ, Collier RJ (eds.). *mBio* 2016;**7**, DOI: 10.1128/mBio.02099-15.
- Doumbou CL, Hamby Salove MK, Crawford DL *et al.* Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 2005;**82**:85–102.
- Duhamel M, Vandenkoornhuyse P. Sustainable agriculture: possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. *Trends Plant Sci* 2013;**18**:597–600.
- Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S *et al.* High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environ Microbiol* 2007;**0**:070816220133002-???
- Elsen A, Gervacio D, Swennen R *et al.* AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* 2008;**18**:251–6.
- Erlacher A, Cardinale M, Grosch R *et al.* The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Front Microbiol* 2014;**5**, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00175.
- Escudié F, Auer L, Bernard M *et al.* FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Berger B (ed.). *Bioinformatics* 2018;**34**:1287–94.
- Faddetta T, Abbate L, Alibrandi P *et al.* The endophytic microbiota of Citrus limon is transmitted from seed to shoot highlighting differences of bacterial and fungal community structures. *Sci Rep* 2021;**11**:7078.
- FAO, ITPS, GSBI, CBD and EC. *State of Knowledge of Soil Biodiversity - Status, Challenges and Potentialities*. FAO, 2020. <https://doi.org/10.4060/cb1928en>
- Ferreira A, Quecine MC, Lacava PT *et al.* Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;**287**:8–14.
- Fierer N, Nemergut D, Knight R *et al.* Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Res Microbiol* 2010;**161**:635–42.
- Finkel OM, Burch AY, Elad T *et al.* Distance-Decay Relationships Partially Determine Diversity Patterns of Phyllosphere Bacteria on Tamrix Trees across the Sonoran Desert. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:6187–93.
- Fitzpatrick CR, Mustafa Z, Viliunas J. Soil microbes alter plant fitness under competition and drought. *J Evol Biol* 2019;**32**:438–50.
- Fitzpatrick CR, Salas-González I, Conway JM *et al.* The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and Beyond. *Annu Rev Microbiol* 2020;**74**:81–100.
- Florin Jean-Michel (ED.) *Viticulture biodynamique "Nouvelles voies pour la culture de la vigne"* Editions MABD 2018.
- Foley JA. Global Consequences of Land Use. *Science* 2005;**309**:570–4.
- Forneck A, Kleinmann S, Blaich R, and Anvari SF. Histochemistry and anatomy of phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine (*Vitis* spp). *Vitis* 2002;**41**:93– 97.
- Fotakis C, Kokkotou K, Zoumpoulakis P *et al.* NMR metabolite fingerprinting in grape derived

## Références Bibliographiques

- products: An overview. *Food Res Int* 2013;**54**:1184–94.
- Foyer J. Synchrétisme des savoirs dans la viticulture biodynamique: Incorporation dans l'expérience et le sensible et trajectoire initiatique. *Rev Anthropol Connaiss* 2018;**12**,**2**:289.
- Fürnkranz M, Wanek W, Richter A *et al.* Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *ISME J* 2008;**2**:561–70.
- García-Díaz A, Marqués MJ, Sastre B *et al.* Labile and stable soil organic carbon and physical improvements using groundcovers in vineyards from central Spain. *Sci Total Environ* 2018;**621**:387–97.
- Gayevskiy V, Goddard MR. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *ISME J* 2012;**6**:1281–90.
- Ghule MR, Sawant IS, Sawant SD *et al.* Identification of *Fusarium* species as putative mycoparasites of *Plasmopara viticola* causing downy mildew in grapevines. *Australas Plant Dis Notes* 2018;**13**:16.
- Gibbons SM, Caporaso JG, Pirrung M *et al.* Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proc Natl Acad Sci* 2013;**110**:4651–5.
- Gibert A, Magda D, Hazard L. Interplay between Endophyte Prevalence, Effects and Transmission: Insights from a Natural Grass Population. Berg G (ed.). *PLOS ONE* 2015;**10**:e0139919.
- Gilbert JA, van der Lelie D, Zarraonaindia I. Microbial terroir for wine grapes. *Proc Natl Acad Sci* 2014;**111**:5–6.
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biol Fertil Soils* 2003;**38**:170–5.
- Giri B, Mukerji KG. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza* 2004;**14**:307–12.
- Gladstones J. Wine, terroir and climate change: Wakefield Press. 2011
- González A, Llorens A, Cervera ML *et al.* Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chem* 2009;**112**:26–34.
- Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R *et al.* Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech* 2015;**5**:355–77.
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC. *J Microbiol Methods* 2015;**110**:7–14.
- Govindasamy V, Franco CMM, Gupta VVSR. Endophytic Actinobacteria: Diversity and Ecology. In: Verma VC, Gange AC (eds.). *Advances in Endophytic Research*. New Delhi: Springer India, 2014, 27–59.
- Grady KL, Sorensen JW, Stopnisek N *et al.* Assembly and seasonality of core phyllosphere microbiota on perennial biofuel crops. *Nat Commun* 2019;**10**:4135.
- Gramaje D, Úrbez-Torres JR, Sosnowski MR. Managing Grapevine Trunk Diseases With Respect to Etiology and Epidemiology: Current Strategies and Future Prospects. :28.
- Groussin M, Mazel F, Sanders JG *et al.* Unraveling the processes shaping mammalian gut microbiomes over evolutionary time. *Nat Commun* 2017;**8**:14319.
- Guerrero R, Margulis L, Berlanga M. Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int Microbiol* 2013;**16**:133-43. doi: 10.2436/20.1501.01.188. PMID: 24568029.
- Guo J, Ling N, Chen Z *et al.* Soil fungal assemblage complexity is dependent on soil fertility and dominated by deterministic processes. *New Phytol* 2020;**226**:232–43.
- Guo J, Ling N, Li Y *et al.* Seed-borne, endospheric and rhizospheric core microbiota as predictors of plant functional traits across rice cultivars are dominated by deterministic processes. *New*



## Références Bibliographiques

- Phytol* 2021;**230**:2047–60.
- Hanning I, Diaz-Sanchez S. The functionality of the gastrointestinal microbiome in non-human animals. *Microbiome* 2015;**3**:51.
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC *et al.* Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat Rev Microbiol* 2012;**10**:497–506.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G *et al.* The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2015;**79**:293–320.
- Hassani MA, Durán P, Hacquard S. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 2018;**6**:58.
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 2008;**11**:296–310.
- Hendgen M, Hoppe B, Döring J *et al.* Effects of different management regimes on microbial biodiversity in vineyard soils. *Sci Rep* 2018;**8**:9393.
- Hijri I, Sýkorová Z, Oehl F *et al.* Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Mol Ecol* 2006;**15**:2277–89.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 2007;**68**:139–46.
- Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S *et al.* Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* 2016;**165**:464–74.
- Hodgson S, de Cates C, Hodgson J *et al.* Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecol Evol* 2014;**4**:1199–208.
- Hol WHG, Garbeva P, Hordijk C *et al.* Non-random species loss in bacterial communities reduces antifungal volatile production. *Ecology* 2015;**96**:2042–8.
- Hubbell SP. *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography*. Princeton University Press (MPB-32). 2001.
- Iannucci A, Canfora L, Nigro F *et al.* Relationships between root morphology, root exudate compounds and rhizosphere microbial community in durum wheat. *Appl Soil Ecol* 2021;**158**:103781.
- Inbaraj MP. Plant-Microbe Interactions in Alleviating Abiotic Stress—A Mini Review. *Front Agron* 2021;**3**:667903.
- Jackson DI, Lombard PB. Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. *Am J Enol Vitic* 1993;**44**:409–430.
- Jacoby R, Peukert M, Succurro A *et al.* The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Front Plant Sci* 2017;**8**:1617.
- Jacoby RP, Koprivova A, Kopriva S. Pinpointing secondary metabolites that shape the composition and function of the plant microbiome. Hancock R (ed.). *J Exp Bot* 2021;**72**:57–69.
- Jiang S, Zhang D, Wang L *et al.* A maize calcium-dependent protein kinase gene, ZmCPK4, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 2013;**71**:112–20.
- Johnston-Monje D, Lundberg DS, Lazarovits G *et al.* Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. *Plant Soil* 2016;**405**:337–55.
- Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature* 2006;**444**:323–9.
- Jumpponen A, Jones KL. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytol* 2010;**186**:496–513.
- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA *et al.* Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *J Chem Ecol* 2012;**38**:651–64.
- Kaur S, Suseela V. Unraveling Arbuscular Mycorrhiza-Induced Changes in Plant Primary and Secondary Metabolome. *Metabolites* 2020;**10**:335.

## Références Bibliographiques

- Kecskeméti E, Berkelmann-Löhnertz B, Reineke A. Are Epiphytic Microbial Communities in the Carposphere of Ripening Grape Clusters (*Vitis vinifera* L.) Different between Conventional, Organic, and Biodynamic Grapes? Cantu D (ed.). *PLOS ONE* 2016;**11**:e0160852.
- Keller M. The science of grapevines: Academic Press. 2020.
- Kew. "The Plant List: *Vitis*". Royal Botanic Gardens 2013.
- Khan AG. Mycorrhizoremediation—An enhanced form of phytoremediation. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006;**7**:503–14.
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y *et al.* Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis. *Science* 2011;**333**:880–2.
- Kment P, Mihaljevič M, Ettlér V *et al.* Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil. *Food Chem* 2005;**91**:157–65.
- Knight S, Goddard MR. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. *ISME J* 2015;**9**:361–70.
- Knight S, Klaere S, Fedrizzi B *et al.* Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Sci Rep* 2015;**5**:14233.
- Knight SJ, Karon O, Goddard MR. Small scale fungal community differentiation in a vineyard system. *Food Microbiol* 2020;**87**:103358.
- Knowlton N, Rohwer F. Multispecies Microbial Mutualisms on Coral Reefs: The Host as a Habitat. *Am Nat* 2003;**162**:S51–62.
- Komárek M, Čadková E, Chrástný V *et al.* Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int* 2010;**36**:138–51.
- Korenblum E, Dong Y, Szymanski J *et al.* Rhizosphere microbiome mediates systemic root metabolite exudation by root-to-root signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2020;**117**:3874–83.
- Koskella B, Bergelson J. The study of host–microbiome (co)evolution across levels of selection. *Trans. R. Soc.* 2020;**B375**: 20190604.
- Ladau J, Elie-Fadrosh EA. Spatial, Temporal, and Phylogenetic Scales of Microbial Ecology. *Trends Microbiol* 2019;**27**:662–9.
- Lau JA, Lennon JT. Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. *Proc Natl Acad Sci* 2012;**109**:14058–62.
- Lederberg J and McCray A. “Ome Sweet `Omics--A Genealogical Treasury of Words.” *The Scientist* 2001;**15**: 8-8.
- Lee J, Laca EA, van Kessel C *et al.* Tillage Effects on Spatiotemporal Variability of Particulate Organic Matter. *Appl Environ Soil Sci* 2009;**2009**:1–14.
- Lee S-M, Kong HG, Song GC *et al.* Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease. *ISME J* 2021;**15**:330–47.
- Leibold MA, Holyoak M, Mouquet N *et al.* The metacommunity concept: A framework for multi-scale community ecology: The metacommunity concept. *Ecology Letters* 2004; **7**:601–613.
- Leopold DR, Busby PE. Host Genotype and Colonist Arrival Order Jointly Govern Plant Microbiome Composition and Function. *Curr Biol* 2020;**30**:3260-3266.e5.
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 1997;**7**:139–53.
- Liang H, Wang X, Yan J *et al.* Characterizing the Intra-Vineyard Variation of Soil Bacterial and Fungal Communities. *Front Microbiol* 2019;**10**:1239.
- Likar M, Stres B, Rusjan D *et al.* Ecological and conventional viticulture gives rise to distinct fungal and bacterial microbial communities in vineyard soils. *Appl Soil Ecol* 2017;**113**:86–95.
- Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the Phyllosphere. *APPL Env MICROBIOL* 2003;**69**:9.
- Liu D, Howell K. Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environ Microbiol* 2020:1462-2920.15172.

## Références Bibliographiques

- Liu D, Zhang P, Chen D *et al.* From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Front Microbiol* 2019;**10**:2679.
- Liu J, Abdelfattah A, Norelli J *et al.* Apple endophytic microbiota of different rootstock/scion combinations suggests a genotype-specific influence. *Microbiome* 2018;**6**:18.
- Locey KJ, Lennon JT. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci* 2016;**113**:5970–5.
- Longa CMO, Nicola L, Antonielli L *et al.* Soil microbiota respond to green manure in organic vineyards. *J Appl Microbiol* 2017;**123**:1547–60.
- Loreau M. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Current Knowledge and Future Challenges. *Science* 2001;**294**:804–8.
- Lortie CJ, Brooker RW, Choler P *et al.* Rethinking plant community theory. *Oikos* 2004;**107**:433–8.
- MacArthur RH & Wilson E O. The Theory of Island Biogeography. In The Theory of Island Biogeography. Princeton University Press. 1967
- Madhusoodanan J. News Feature: Do hosts and their microbes evolve as a unit? *Proc Natl Acad Sci* 2019;**116**:14391–4.
- Mahé F, Rognes T, Quince C *et al.* Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2014;**2**:e593.
- Mahé S, Duhamel M, Le Calvez T *et al.* PHYMYCO-DB: A Curated Database for Analyses of Fungal Diversity and Evolution. Steinke D (ed.). *PLoS ONE* 2012;**7**:e43117.
- Mandl K, Schieck J, Silhavy-Richter K *et al.* Vines take up yeasts from soil and transport them through the vine to the stem and skins of grapes. :8.
- Marasco R, Rolli E, Fusi M *et al.* Grapevine rootstocks shape underground bacterial microbiome and networking but not potential functionality. *Microbiome* 2018;**6**:3.
- Margulis L. Words as battle cries: Symbiogenesis and the new field of endocytobiology. *Biosci* 1991;**40**: 673-677.
- Margulis L. Symbiogenesis and symbiogenesis. In L Margulis & R Fester (eds.) Symbiosis as a source of evolutionary innovation. London, The MIT Press; 1-14.
- Margulis L. Symbiogenesis. A new principle of evolution rediscovery of Boris Mikhaylovich Kozo-Polyansky (1890–1957). *Paleontol J* 2010;**44**:1525–39.
- Martínez-Diz M del P, Andrés-Sodupe M, Bujanda R *et al.* Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. *Fungal Ecol* 2019;**41**:234–44.
- Martínez-García LB, Korthals G, Brussaard L *et al.* Organic management and cover crop species steer soil microbial community structure and functionality along with soil organic matter properties. *Agric Ecosyst Environ* 2018;**263**:7–17.
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH *et al.* Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* 2006;**4**:102–12.
- Maturano YP, Mestre MV, Esteve-Zarzoso B *et al.* Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines. *Int J Food Microbiol* 2015;**199**:23–32.
- Mazzocchi C, Ruggeri G, Corsi S. Consumers' preferences for biodiversity in vineyards: A choice experiment on wine. *Wine Econ Policy* 2019;**8**:155–64.
- Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 2013;**37**:634–63.
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I *et al.* Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. 2011;**332**:5.
- Mezzasalma V, Sandionigi A, Guzzetti L *et al.* Geographical and Cultivar Features Differentiate Grape Microbiota in Northern Italy and Spain Vineyards. *Front Microbiol* 2018;**9**:946.
- Middleton H, Yergeau É, Monard C *et al.* Rhizospheric Plant–Microbe Interactions: miRNAs as a Key

## Références Bibliographiques

- Mediator. *Trends Plant Sci* 2021;**26**:132–41.
- Miozzi L, Vaira AM, Catoni M *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Plant Friend or Foe in the Fight Against Viruses? *Front Microbiol* 2019;**10**:1238.
- Mirshad PP, Puthur JT. Arbuscular mycorrhizal association enhances drought tolerance potential of promising bioenergy grass (*Saccharum arundinaceum* retz.). *Environ Monit Assess* 2016;**188**:425.
- Miura T, Sánchez R, Castañeda LE *et al.* Is microbial terroir related to geographic distance between vineyards?: Microbial terroir related to geographic distance. *Environ Microbiol Rep* 2017;**9**:742–9.
- Mony C, Vandenkoornhuysen P, Bohannan BJM *et al.* A Landscape of Opportunities for Microbial Ecology Research. *Front Microbiol* 2020a;**11**:561427.
- Mony C, Vannier N, Brunellière P *et al.* The influence of host-plant connectivity on fungal assemblages in the root microbiota of *Brachypodium pinnatum*. *Ecology* 2020b;**101**, DOI: 10.1002/ecy.2976.
- Moran NA, Sloan DB. The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLOS Biol* 2015;**13**:e1002311.
- Morimoto J, Simpson SJ, Ponton F. Direct and trans-generational effects of male and female gut microbiota in *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett* 2017;**13**:20160966.
- Morris JJ. What is the hologenome concept of evolution? *F1000Research* 2018;**7**:1664.
- Morrison-Whittle P, Goddard MR. Quantifying the relative roles of selective and neutral processes in defining eukaryotic microbial communities. *ISME J* 2015;**9**:2003–11.
- Morrison-Whittle P, Goddard MR. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation: The origins of microbial diversity in wine. *Environ Microbiol* 2018;**20**:75–84.
- Morrison-Whittle P, Lee SA, Goddard MR. Fungal communities are differentially affected by conventional and biodynamic agricultural management approaches in vineyard ecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 2017;**246**:306–13.
- Mougel C, Offre P, Ranjard L *et al.* Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytol* 2006;**170**:165–75.
- Müller DB, Vogel C, Bai Y *et al.* The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annu Rev Genet* 2016;**50**:211–34.
- Muñoz-Leoz B, Garbisa C, Antigüedad I *et al.* Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. *Soil Biol Biochem* 2012;**48**:125–34.
- Musetti R, Vecchione A, Stringher L *et al.* Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology*® 2006;**96**:689–98.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT *et al.* Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci* 2017;**68**:12–26.
- Naylor D, Coleman-Derr D. Drought Stress and Root-Associated Bacterial Communities. *Front Plant Sci* 2018;**8**:2223.
- Nemergut DR, Schmidt SK, Fukami T *et al.* Patterns and Processes of Microbial Community Assembly. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013;**77**:342–56.
- Nishad R, Ahmed T, Rahman VJ *et al.* Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Front Microbiol* 2020;**11**:1298.
- Ofek M, Voronov-Goldman M, Hadar Y *et al.* Host signature effect on plant root-associated microbiomes revealed through analyses of resident vs . active communities: Host effect on plant root-associated microbiomes. *Environ Microbiol* 2014;**16**:2157–67.
- OIV -International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation 2019 - STATISTICAL REPORT ON WORLD VITIVINICULTURE.

## Références Bibliographiques

- Olanrewaju OS, Ayangbenro AS, Glick BR *et al.* Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;**103**:1155–66.
- Olanrewaju OS, Babalola OO. Streptomyces: implications and interactions in plant growth promotion. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019;**103**:1179–88.
- Ortiz-Álvarez R, Ortega-Arranz H, Ontiveros VJ *et al.* *Emergent Properties in Microbiome Networks Reveal the Anthropogenic Disturbance of Farming Practices in Vineyard Soil Fungal Communities*. Ecology, 2020.
- Pacifico D, Squartini A, Crucitti D *et al.* The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers. *Front Plant Sci* 2019;**10**:1256.
- Paiola A, Assandri G, Brambilla M *et al.* Exploring the potential of vineyards for biodiversity conservation and delivery of biodiversity-mediated ecosystem services: A global-scale systematic review. *Sci Total Environ* 2020;**706**:135839.
- Pandiyan K, Kushwaha P, Kashyap PL *et al.* Phyllosphere microbiome: modern prospectus and application. *Microbiomes and Plant Health*. Elsevier, 2021, 345–66.
- Panke-Buisse K, Poole AC, Goodrich JK *et al.* Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME J* 2015;**9**:980–9.
- Pauvert C, Buée M, Laval V *et al.* Bioinformatics matters: The accuracy of plant and soil fungal community data is highly dependent on the metabarcoding pipeline. *Fungal Ecol* 2019;**41**:23–33.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O *et al.* Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proc Natl Acad Sci* 2013;**110**:6548–53.
- Pepi S, Vaccaro C. Geochemical fingerprints of “Prosecco” wine based on major and trace elements. *Environ Geochem Health* 2018;**40**:833–47.
- Perazzolli M, Antonielli L, Storari M *et al.* Resilience of the Natural Phyllosphere Microbiota of the Grapevine to Chemical and Biological Pesticides. Drake HL (ed.). *Appl Environ Microbiol* 2014;**80**:3585–96.
- Pereira GE, Gaudillere J-P, Van Leeuwen C *et al.* <sup>1</sup> H NMR and Chemometrics To Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux, France. *J Agric Food Chem* 2005;**53**:6382–9.
- Pérez-Jaramillo JE, Carrión VJ, Bosse M *et al.* Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *ISME J* 2017;**11**:2244–57.
- Pieterse CM, Zamioudis C, Berendsen RL *et al.* Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Ann. Rev. Phytopathol* 2014;**52**:347–375
- Pinto C, Pinho D, Sousa S *et al.* Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. Driks A (ed.). *PLoS ONE* 2014;**9**:e85622.
- Porrás-Soriano A, Soriano-Martín ML, Porrás-Piedra A *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. *J Plant Physiol* 2009;**166**:1350–9.
- Poudel R, Jumpponen A, Kennelly MM *et al.* Rootstocks Shape the Rhizobiome: Rhizosphere and Endosphere Bacterial Communities in the Grafted Tomato System. Müller V (ed.). *Appl Environ Microbiol* 2018;**85**:e01765-18, /aem/85/2/AEM.01765-18.atom.
- Power AG. Ecosystem services and agriculture: tradeoffs and synergies. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2010;**365**:2959–71.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2012;**41**:D590–6.
- Radić T, Likar M, Hančević K *et al.* Occurrence of root endophytic fungi in organic versus conventional vineyards on the Croatian coast. *Agric Ecosyst Environ* 2014;**192**:115–21.

## Références Bibliographiques

- Ramos IJ, Ribeiro JA, Figueiredo D. Effects of vineyard agricultural practices on the diversity of macroinvertebrates. Aurand J-M (ed.). *BIO Web Conf* 2019;**12**:01004.
- Ravanbakhsh M, Kowalchuk GA, Jousset A. Targeted plant hologenome editing for plant trait enhancement. *New Phytol* 2021;**229**:1067–77.
- Reinhold-Hurek B, Büniger W, Burbano CS *et al.* Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. *Annu Rev Phytopathol* 2015;**53**:403–24.
- Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Aust J Grape Wine Res* 2005;**11**:316–27.
- Riaz M, Kamran M, Fang Y *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: A critical review. *J Hazard Mater* 2021;**402**:123919.
- Richardson AE, Barea J-M, McNeill AM *et al.* Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 2009;**321**:305–39.
- Richardson AE, Simpson RJ. Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiol* 2011;**156**:989–96.
- Rocca JD, Simonin M, Blaszcak JR *et al.* The Microbiome Stress Project: Toward a Global Meta-Analysis of Environmental Stressors and Their Effects on Microbial Communities. *Front Microbiol* 2019;**9**:3272.
- Rodríguez-Ezpeleta N, Zinger L, Kinziger A *et al.* Biodiversity monitoring using environmental DNA. *Mol Ecol Resour* 2021;**21**:1405–9.
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F *et al.* Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 2002;**243**:1–10.
- Rolli E, Marasco R, Vigani G *et al.* Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait: Root bacteria protect plants from drought. *Environ Microbiol* 2015;**17**:316–31.
- Rosenberg E, Sharon G, Atad I *et al.* The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms: Evolution via symbiosis. *Environ Microbiol Rep* 2010;**2**:500–6.
- Ruan Y, Wang T, Guo S *et al.* Plant Grafting Shapes Complexity and Co-occurrence of Rhizobacterial Assemblages. *Microb Ecol* 2020;**80**:643–55.
- Saijo Y, Loo EP, Yasuda S. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J* 2018;**93**:592–613.
- Saleem M, Law AD, Sahib MR *et al.* Impact of root system architecture on rhizosphere and root microbiome. *Rhizosphere* 2018;**6**:47–51.
- Samaddar S, Chatterjee P, Roy Choudhury A *et al.* Interactions between *Pseudomonas* spp. and their role in improving the red pepper plant growth under salinity stress. *Microbiol Res* 2019;**219**:66–73.
- Sanchez-Bel P, Troncho P, Gamir J *et al.* The Nitrogen Availability Interferes with Mycorrhiza-Induced Resistance against *Botrytis cinerea* in Tomato. *Front Microbiol* 2016;**7**, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01598.
- dos Santos Lopes MJ, Dias Filho MB, dos Reis Castro TH *et al.* Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* on the Growth Improvement and Physiological Responses in *Brachiaria brizantha*. *Am J Plant Sci* 2018;**09**:250–65.
- Sasse J, Martinoia E, Northen T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends Plant Sci* 2018;**23**:25–41.
- Schrey SD, Tarkka MT. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008;**94**:11–9.
- Selosse M-A, Baudoin E, Vandenkoornhuyse P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological

## Références Bibliographiques

- success and protection of plants. *C R Biol* 2004;**327**:639–48.
- Selosse M-A, Richard F, He X *et al.* Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends Ecol Evol* 2006;**21**:621–8.
- Selosse M-A. Communication; espace des sciences (Rennes). Février 2020.
- Shade A, Jacques M-A, Barret M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr Opin Microbiol* 2017;**37**:15–22.
- Sharma MP, Grover M, Chourasiya D *et al.* Deciphering the Role of Trehalose in Tripartite Symbiosis Among Rhizobia, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, and Legumes for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Microbiol* 2020;**11**:509919.
- Singh P, Santoni S, Weber A *et al.* Understanding the phyllosphere microbiome assemblage in grape species (Vitaceae) with amplicon sequence data structures. *Sci Rep* 2019;**9**:14294.
- Skillings, D. Holobionts and the ecology of organisms: Multi-species communities or integrated individuals?. *Biol Philos* 2016;**31**:875–892.
- Slama I, Abdelly C, Bouchereau A *et al.* Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Ann Bot* 2015;**115**:433–47.
- Smith FA, Grace EJ, Smith SE. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytol* 2009;**182**:347–58.
- Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3. ed., Repr. Amsterdam: Elsevier/Acad. Press, 2009.
- Song T, Xu H, Sun N *et al.* Metabolomic Analysis of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Root-Symbiotic Rhizobia Responses under Alkali Stress. *Front Plant Sci* 2017;**8**:1208.
- Song YY, Ye M, Li CY *et al.* Priming of Anti-Herbivore Defense in Tomato by Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Involvement of the Jasmonate Pathway. *J Chem Ecol* 2013;**39**:1036–44.
- Sugiyama A, Bakker MG, Badri DV *et al.* Relationships between *Arabidopsis* genotype-specific biomass accumulation and associated soil microbial communities. *Botany* 2003;**91**:123–126.
- State of Knowledge of Soil Biodiversity - Status, Challenges and Potentialities*. FAO, 2020.
- Steenwerth KL, Morelan I, Stahel R *et al.* Fungal and bacterial communities of ‘Pinot noir’ must: effects of vintage, growing region, climate, and basic must chemistry. *PeerJ* 2021;**9**:e10836.
- Tamburini G, Bommarco R, Wanger TC *et al.* Agricultural diversification promotes multiple ecosystem services without compromising yield. *Sci Adv* 2020;**6**:eaba1715.
- Tedersoo L, Albertsen M, Anslan S *et al.* Perspectives and Benefits of High-Throughput Long-Read Sequencing in Microbial Ecology. Druzhinina IS (ed.). *Appl Environ Microbiol* 2021;**87**, DOI: 10.1128/AEM.00626-21.
- Teixeira PJP, Colaianni NR, Fitzpatrick CR *et al.* Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Curr Opin Microbiol* 2019;**49**:7–17.
- Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL *et al.* Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. Gilbert JA (ed.). *mSystems* 2016;**1**, DOI: 10.1128/mSystems.00028-16.
- Tierney BT, Yang Z, Luber JM *et al.* The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome. *Cell Host Microbe* 2019;**26**:283–295.e8.
- Tilman D. Forecasting Agriculturally Driven Global Environmental Change. *Science* 2001;**292**:281–4.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA *et al.* Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 2002;**418**:671–7.
- Tilman D, Clark M, Williams DR *et al.* Future threats to biodiversity and pathways to their prevention. *Nature* 2017;**546**:73–81.
- Tkacz A, Bestion E, Bo Z *et al.* Influence of Plant Fraction, Soil, and Plant Species on Microbiota: a Multikingdom Comparison. Bailey MJ (ed.). *mBio* 2020;**11**, DOI: 10.1128/mBio.02785-19.
- Toju H, Okayasu K, Notaguchi M. Leaf-associated microbiomes of grafted tomato plants. *Sci Rep*

## Références Bibliographiques

- 2019;**9**:1787.
- Trivedi P, Leach JE, Tringe SG *et al.* Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat Rev Microbiol* 2020;**18**:607–21.
- Trivedi P, Mattupalli C, Eversole K *et al.* Enabling sustainable agriculture through understanding and enhancement of microbiomes. *New Phytol* 2021;**230**:2129–47.
- Trouvelot S, Bonneau L, Redecker D *et al.* Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agron Sustain Dev* 2015;**35**:1449–67.
- Truyens S, Weyens N, Cuypers A *et al.* Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants: Bacterial seed endophytes. *Environ Microbiol Rep* 2015;**7**:40–50.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M *et al.* The Human Microbiome Project. *Nature* 2007;**449**:804–10.
- Upadhyay SK, Singh JS, Saxena AK *et al.* Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions: Effect of rhizobacteria on wheat in saline conditions. *Plant Biol* 2012;**14**:605–11.
- Van Der Heijden MGA, Wiemken A, Sanders IR. Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytol* 2003;**157**:569–78.
- Van Leeuwen C, Roby J-P, De Rességuier L. Soil-related terroir factors: a review. *OENO One* 2018;**52**:173–88.
- Van Leeuwen C, Seguin G. The concept of terroir in viticulture. *J Wine Res* 2006;**17**:1–10.
- Vandenkoornhuyse P, Husband R, Daniell TJ *et al.* Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol Ecol* 2002;**11**:1555–64.
- Vandenkoornhuyse P, Quaiser A, Duhamel M *et al.* The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol* 2015;**206**:1196–206.
- Vannier N, Bittebiere A-K, Mony C *et al.* Root endophytic fungi impact host plant biomass and respond to plant composition at varying spatio-temporal scales. *Fungal Ecol* 2020;**44**:100907.
- Vannier N, Mony C, Bittebière A-K *et al.* Epigenetic Mechanisms and Microbiota as a Toolbox for Plant Phenotypic Adjustment to Environment. *Front Plant Sci* 2015;**6**, DOI: 10.3389/fpls.2015.01159.
- Vannier N, Mony C, Bittebiere A-K *et al.* A microorganisms' journey between plant generations. *Microbiome* 2018;**6**:79.
- Vannier N, Mony C, Bittebiere A-K *et al.* Clonal Plants as Meta-Holobionts. Heck M (ed.). *mSystems* 2019;**4**, DOI: 10.1128/mSystems.00213-18.
- Vega-Avila AD, Gumiere T, Andrade PAM *et al.* Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015;**107**:575–88.
- Vellend M. Conceptual Synthesis in Community Ecology. *Q Rev Biol* 2010;**85**:183–206.
- Vellend M. The Theory of Ecological Communities. Princeton University Press (MPB-57). 2016.
- Vink SN, Chrysargyris A, Tzortzakis N *et al.* Bacterial community dynamics varies with soil management and irrigation practices in grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Appl Soil Ecol* 2021;**158**:103807.
- Vitulo N, Lemos WJF, Calgaro M *et al.* Bark and Grape Microbiome of *Vitis vinifera*: Influence of Geographic Patterns and Agronomic Management on Bacterial Diversity. *Front Microbiol* 2019;**9**:3203.
- Vogelsang KM, Reynolds HL, Bever JD. Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytol* 2006;**172**:554–62.
- Vos CM, Tesfahun AN, Panis B *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Appl Soil Ecol* 2012;**61**:1–6.



## Références Bibliographiques

- Vukicevich E, Lowery T, Bowen P *et al.* Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture. A review. *Agron Sustain Dev* 2016;**36**:48.
- Wahdan SFM, Tanunchai B, Wu Y *et al.* Deciphering *Trifolium pratense* L. holobiont reveals a microbiome resilient to future climate changes. *MicrobiologyOpen* 2021;**10**, DOI: 10.1002/mbo3.1217.
- Walsh BS, Heys C, Lewis Z. Gut microbiota influences female choice and fecundity in the nuptial gift-giving species, *Drosophila subobscura* (Diptera: Drosophilidae). *Eur J Entomol* 2017;**114**:439–45.
- Wen J, Xiong Z, Nie Z-L *et al.* Transcriptome Sequences Resolve Deep Relationships of the Grape Family. Candela H (ed.). *PLoS ONE* 2013;**8**:e74394.
- Werner GDA, Kiers ET. Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. *New Phytol* 2015;**205**:1515–24.
- White R. Understanding Vineyard Soils. Oxford: Oxford University Press 2015.
- Wilkinson DM. The Role of Seed Dispersal in the Evolution of Mycorrhizae. *Oikos* 1997;**78**:394.
- Wilkinson DM, Sherratt TN. Horizontally acquired mutualisms, an unsolved problem in ecology? *Oikos* 2001;**92**:377–84.
- Wong AC-N, Dobson AJ, Douglas AE. Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet. *J Exp Biol* 2014;jeb.101725.
- Xiong C, Singh BK, He J-Z *et al.* Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome. *Microbiome* 2021a;**9**:171.
- Xiong C, Zhu Y, Wang J *et al.* Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity. *New Phytol* 2021b;**229**:1091–104.
- Yang T, Chen Y, Wang X-X *et al.* Plant symbionts: keys to the phytosphere. *Symbiosis* 2013;**59**:1–14.
- Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P *et al.* The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. Jansson JK (ed.). *mBio* 2015;**6**:e02527-14.
- Zhang J, Elser JJ. Carbon:Nitrogen:Phosphorus Stoichiometry in Fungi: A Meta-Analysis. *Front Microbiol* 2017;**8**:1281.
- Zhang N, Wen J, Zimmer EA. Congruent Deep Relationships in the Grape Family (Vitaceae) Based on Sequences of Chloroplast Genomes and Mitochondrial Genes via Genome Skimming. Candela H (ed.). *PLOS ONE* 2015;**10**:e0144701.
- Zhang W, Xie Z, Zhang X *et al.* Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status. *J Plant Interact* 2019;**14**:580–9.
- Zhou J, Cavagnaro TR, De Bei R *et al.* Wine Terroir and the Soil Bacteria: An Amplicon Sequencing-Based Assessment of the Barossa Valley and Its Sub-Regions. *Front Microbiol* 2021;**11**:597944.
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev* 2008;**32**:723–35.
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Microbial-driven genetic variation in holobionts. *FEMS Microbiol Rev* 2021:fuab022.
- Zinger L, Boetius A, Ramette A. Bacterial taxa–area and distance–decay relationships in marine environments. *Mol Ecol* 2014;**23**:954–64.
- Zinger L, Bonin A, Alsos IG *et al.* DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Mol Ecol* 2019;**28**:1857–62.
- Zúñiga A, Donoso RA, Ruiz D *et al.* Quorum-Sensing Systems in the Plant Growth-Promoting Bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN Exhibit Cross-Regulation and Are Involved in Biofilm Formation. *Mol Plant-Microbe Interactions*® 2017;**30**:557–65.

## ANNEXES

### Article additionnel

Durant ces 3 ans de thèse, j'ai eu l'opportunité d'être intégrée à d'autres projets parallèles, dont un projet sur le microbiote du blé. Pour ce projet, j'ai pu être associée aux auteurs de l'article (article accepté).

-Mauger S.\*, Ricono C.\*, Mony C., Chable V., Serpolay E., **Biget M.**, Vandenkoornhuyse P. Differentiation of endospheric microbiota in ancient and modern wheat cultivars roots (2021). *Plant-Environment Interactions*. Accepted September 2021. doi: 10.1002/pei3.10062

Dans cet article, j'ai réalisé les étapes de biologie moléculaire : production d'amplicon fongique ainsi que la partie préparation des banques (bactéries et champignons) de séquençage et les séquençages. J'ai également analysé les données brutes de séquençage afin de fournir aux deux co-auteurs, les tables de contingences. J'ai participé aux discussions concernant les résultats et leur interprétations ainsi qu'à la relecture du papier.

**Tableau 1 : Informations complémentaires sur les parcelles échantillonnées**

Field	Propriétés physico-chimiques du sol				Données de la vigne		
	% OM	C/N ratio	pH	P2O5 (g/kg)	Année (plantation)	Cépage	Porte-greffe
P103	1.85	11.69	7.73	0.075	2003	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P106	1.34	10.82	6.63	0.098	2005	Merlot	101.14MG
P108	2.22	12.18	6.3	0.066	2011	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P1	3	11.7	7.1	0.163	1969	Cabernet-Sauvignon	SO4
P10e	1.9	10.4	8.3	0.203	1970	Cabernet-Sauvignon	SO5
P112a	2.11	6.32	7.97	0.097	2011	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P16	2.07	9.19	7.8	0.545	1993	Merlot	/
P18	3.9	12.4	6.5	0.133	1975	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P19	1.52	8.66	6.75	0.251	1985	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P23a	2.4	10.5	7.1	0.185	1965	Merlot	RG
P25	2.8	10.2	6.3	0.174	1945	Cabernet-Sauvignon	RG
P26	2.7	13.6	7.4	0.235	1945	Merlot	RG
P31	3.9	14.1	6.3	0.231	1967	Cabernet-Sauvignon	SO4
P33	2.8	10.8	6.9	0.224	1987	Merlot	SO4
P35	1.77	10.61	6.73	0.218	1959	Merlot	161-49C
P38	2.7	10.6	7.3	0.244	1944	Merlot	101.14MG
P3a	2.4	12.9	7.5	0.18	1983	Cabernet-Sauvignon	3309C
P42	1.86	11.38	7.84	0.354	1979	Merlot	/
P44	1.4	12.7	6.7	0.155	2012	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P47	0.67	12.17	7.87	0.133	2008	Merlot	101.14MG
P4	1.31	16.56	7.14	0.143	1982	Merlot	101.14MG
P51	1.46	10.48	7.91	0.258	2002	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P52a	1.5	12	7.6	0.156	1988	Merlot	/

P56	1.32	9.25	7.33	0.111	1966	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P57	1.21	8.48	7.43	0.144	1986	Cabernet-Sauvignon	RG
P62	1.24	9.49	7.19	0.126	2014	Merlot	/
P63	1.29	7.21	8.1	0.106	1974	Merlot	SO4
P64b	0.43	4.46	6.52	0.047	1984	Merlot	3309C
P64c	0.97	9.25	6.27	0.048	1974	Merlot	SO4
P68	1.25	8.97	6.04	0.235	1979	Cabernet-Sauvignon	/
P69	1.29	11.03	7.01	0.127	1989	Merlot	3309C
P6	2.2	11.2	6.8	0.228	1972	Cabernet-Sauvignon	SO4
P84a	1.35	12.46	7.4	0.212	2015	Merlot	101.14MG
P84b	1.73	12.27	7.84	0.173	2015	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P11	2.6	11.3	7.3	0.168	1938	Merlot	RG
P58a	3.69	11.85	7.15	0.091	1999	Cabernet-Sauvignon	101.14MG
P59b	1.6	9.12	6.63	0.104	1992	Merlot	101.14MG
<b>Mean (SD)</b>	1.94 (0.84)	10.76 (2.21)	7.15 (0.59)	0.17 (0.09)	1983 (21)	NA	NA
<b>Min</b>	0.43	4.46	6.04	0.05	1938	NA	NA
<b>Max</b>	3.90	16.56	8.30	0.55	2015	NA	NA





**Titre : La vigne comme Holobionte : validité du concept, dynamique temporelle, déterminants environnementaux et application à la définition du *terroir microbiologique***

**Mots clés :** holobionte, écologie microbienne, déterminisme, endosphère racinaire, vignes, *terroir microbiologique*.

**Résumé :** Le concept d'holobionte considère l'unité fonctionnelle composée des plantes et de ces microorganismes. Il promeut une approche holistique à la gestion des cultures et, plus généralement, à la vision du vivant. Cependant, ce concept est sujet à débat en raison du manque de preuves expérimentales de son existence. De plus, la compréhension fine des mécanismes régissant l'assemblage des microorganismes associés aux plantes reste un des enjeux majeurs de l'écologie microbienne et de l'agriculture. Le but de cette thèse était de tester la validité du concept d'holobionte, d'étudier les facteurs qui impactent l'assemblage des communautés microbiennes de l'endosphère racinaire et d'analyser la dynamique intra- et inter-annuelle du microbiote de la vigne. Grâce à une expérimentation mise en place en association avec une pépinière viticole (greffage et plantes chimériques), nous avons pu démontrer l'existence d'un recrutement actif et déterminé de microorganismes par la plante, sous l'effet dominant du porte-greffe, ce qui nous a permis d'augmenter les preuves expérimentales à l'existence du concept d'holobionte. Dans le cadre d'une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux dynamiques d'assemblages du microbiote de la vigne, grâce à un vaste plan d'échantillonnage mis en place au sein d'un domaine viticole. Nous avons mis en avant le rôle fondamental des facteurs environnementaux, de l'âge et du cépage dans l'assemblage du microbiote endosphérique racinaire de la vigne à petite échelle géographique et l'existence de patrons temporels intra-annuels marqués dans la structuration de ces communautés. Ces travaux fournissent un ensemble de connaissances nouvelles dans le domaine de l'écologie microbienne, soutiennent l'existence d'un *terroir microbiologique* et soulignent l'importance de la prise en compte de ce *terroir* microbien dans le cadre d'une gestion durable de la vigne.

**Title:** The grapevine as an Holobiont: validity of the concept, temporal dynamics, environmental drivers and application to the definition of the microbial *terroir*

**Key words:** holobiont, microbial ecology, determinism, root endosphere, grapevines, *microbial terroir*

**Abstract:** The holobiont concept considers the functional unit composed of plants and these microorganisms. It promotes a holistic approach to crop management and, more generally, to the vision of macroorganisms. However, this concept is subject to debate due to the lack of experimental evidence of its existence. Moreover, a better understanding of the mechanisms governing the assembly of microbial communities associated with plants remains one of the major challenges of microbial ecology and agriculture. The overall objective of this thesis was to test the validity of the concept of holobiont, to study the factors that impact the assembly of root-endosphere microbial communities and to analyze the intra- and inter-annual dynamics of the grapevine microbiota. Thanks to an experiment set up in association with a vine nursery (grafting and chimeric plants), we demonstrated the existence of an active and determined recruitment of microorganisms by the plant, under the dominant effect of the rootstock, which allowed us to increase the experimental evidence for the existence of the holobiont concept. In a second part, thanks to a large sampling design set up in a single vineyard, we investigated the dynamics of grapevine microbiota assembly. We highlighted the fundamental role of environmental factors, age and grape variety (cultivar) in the assembly of the root-endosphere microbiota of grapevine on a small geographical scale and evidence of clear intra-annual temporal patterns in the structuring of these communities. This thesis provides a body of new knowledge in the field of microbial ecology, supports the existence of the microbial *terroir* and underlines the importance of taking this microbial *terroir* into account in the context of sustainable vineyard management.