

Maladies du bois : mise au point d'un modèle simplifié en vue de tester des moyens de lutte

Florence Fontaine

Université de Reims Champagne-Ardenne
(URCA), UFR Sciences Exactes et
Naturelles, Laboratoire Stress Défense et
Reproduction des Plantes EA 4707

Moulin de la Housse
51687 Reims Cedex 2
florence.fontaine@univ-reims.fr

En quelques mots

Les maladies du bois de la vigne sont très préoccupantes actuellement. Face à l'ampleur des pertes causées par ces maladies et aux moyens de lutte limités, notre projet a pour objectif de mettre au point un modèle simplifié pour tester des moyens de lutte chimique et/ou bio-

logique. Le modèle simplifié développé consiste à inoculer des boutures végétatives au niveau de la tige par des champignons pathogènes impliqués dans les maladies du bois. Les moyens de lutte testés sont de nature biologique par l'utilisation de micro-organismes appliqués dans le sol associé à une application foliaire de fongicides am-

bimobiles. Ces traitements sont testés pour l'instant de façon préventive, c'est-à-dire avant l'inoculation des boutures par les pathogènes. Certaines molécules sont actuellement testées in planta et d'autres sont en cours de développement. Les premiers résultats sont encourageants, nous devons toutefois répéter nos expériences.

Objectifs de l'étude

Les maladies du bois sont considérées comme très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole, une brusque recrudescence de l'esca ayant été notée en 2003 soit deux ans après l'interdiction de l'arsénite de sodium en raison de sa toxicité. Elles provoquent à plus ou moins long terme la mort du cep et peuvent conduire à un renouvellement annuel des plants pouvant atteindre plus de 10 % d'un vignoble (Grosman et Doublet, 2012). L'impact économique est maintenant tel que la pérennité de certaines exploitations est menacée. Pour combattre les maladies du bois, hormis d'indispensables mesures prophylactiques mais qui restent insuffisantes, les moyens de lutte en remplacement de l'arsénite de sodium et au même niveau d'efficacité sont inexistantes. Trouver un produit de substitution à l'arsenic, un élément nécessaire à la vie cellulaire à très faible dose mais éminemment toxique aux concentrations employées dans la lutte contre l'esca, est un enjeu difficile mais dont

l'importance est primordiale. La proposition aux viticulteurs de nouveaux moyens de lutte ne pourra se faire qu'en ayant une meilleure compréhension de la maladie, ce qui implique notamment une caractérisation d'une part de l'interaction hôte-pathogènes et d'autre part, de l'état physiologique de la plante et en particulier, sa capacité à activer des réponses de défense. Les études menées dans le vignoble Champenois sur le cépage Chardonnay ont montré que la plante perçoit un stress et active des réponses de défenses différentes selon la forme de la maladie exprimée, chronique ou apoplectique. Par ailleurs, les études menées à Poitiers ont montré que la stratégie qui consiste à utiliser des fongicides ambimobiles appliqués en pulvérisation foliaire paraissait valide au moins sur *Eutypa lata* inoculé dans des boutures de sauvignon. Afin de mieux appréhender les interactions hôte-pathogènes, il est nécessaire de développer un modèle d'étude fiable des maladies du bois esca/BDA. Ce modèle va consister en des boutures inoculées repro-

duisant à la fois les nécroses dans le bois (année de l'inoculation) et les symptômes foliaires (année suivante). Ce modèle doit aussi permettre d'avoir un outil fiable pour pouvoir tester aisément de nouveaux moyens de lutte originaux, qu'ils soient d'origine chimique et/ou biologique. Nous n'avions pas jusqu'alors de modèle de plante contaminée nous permettant d'avoir rapidement des résultats.

Les objectifs de notre étude sont ⁽¹⁾ de poursuivre l'acquisition de connaissances sur l'origine de l'expression des symptômes de l'esca/BDA et ⁽²⁾ de tester des moyens de lutte originaux, chimique et/ou biologique, ce second point correspondant évidemment à une attente forte des viticulteurs, la pérennité de certaines exploitations étant menacée. Soulignons que pour mener à bien ces deux objectifs et en particulier pouvoir évaluer aisément l'efficacité de nouveaux traitements, il est indispensable d'achever la mise au point d'un modèle de contamination fiable.

Résultats

Mise au point du modèle simplifié

État de l'art

Au vignoble, une caractérisation de l'état physiologique de la plante (feuilles, tige herbacée, tronc, bande brune), avant et au cours de l'expression de la maladie, a été initiée au vignoble sur le cépage Chardonnay depuis 2005. Les principaux résultats sont les suivants :

- Au niveau des feuilles et pour la forme apoplectique, la plante, qui active des réponses de défense, est sujette à divers désordres métaboliques avant l'expression visible de la maladie. Ces réponses sont maximales seulement 24 heures avant le dessèchement total des feuilles. Pour la forme lente, la photosynthèse est perturbée et l'expression de gènes de stress est activée, ceci avant l'expression visible des symptômes (Létousey et al., 2008 ; Magnin-Robert et al., 2011) ;
- Au niveau de la tige herbacée et pour les deux formes de la maladie, une réponse similaire est observée entre les plantes asymptomatiques et les porteurs sains (pas de symptômes foliaires au cours des 10 dernières années) (Spagnolo et al., 2012). En

revanche et toujours pour les deux formes de la maladie, des différences quantitatives significatives sont détectées pour de nombreuses protéines issues des tiges herbacées symptomatiques et celles de porteurs sains ;

- Au niveau du tronc, l'altération de certaines voies métaboliques diffère entre le bois de la zone blanche et celui de la zone ponctuée et ceci indépendamment du type de cep, porteur sain ou malade (Spagnolo et al., 2014).

L'ensemble de ces connaissances nous a permis de progresser dans la compréhension de l'interaction hôte-pathogènes. Toutefois, nous pouvons souligner deux limitations de cette étude qui sont d'une part l'absence de vrais ceps témoins (sans champignons pathogènes) et d'autre part, nous ne savons pas quand a eu lieu l'étape d'inoculation des pathogènes.

Afin d'approfondir les connaissances de cette interaction, un modèle simplifié à l'aide de greffés-soudés et de boutures végétatives a été développé au sein de l'URCA.

Développement du modèle simplifié

À l'aide de boutures végétatives, la phase d'infection avec les deux champignons pathogènes de la famille des Botryosphaeriaceae (avec à chaque fois une souche virulente, *Neofusicoccum parvum*, et une peu virulente, *Diplodia seriata*) est maîtrisée et nous obtenons des nécroses dans le bois. Le protocole est le suivant :

- l'organe inoculé est la tige herbacée ;
- la période d'inoculation optimale est au stade de développement de 6-7 feuilles, ce qui correspond à des boutures âgées entre 8 et 9 semaines ;
- l'obtention d'une nécrose est observée au bout d'un mois après infection ;
- les champignons inoculés sont résolés 1 mois et demi après l'inoculation.

Actuellement, la taille des nécroses induites suite à l'inoculation des pathogènes est le principal indicateur utilisé et elle traduit l'agressivité des pathogènes et la réponse de la plante. À l'aide de ce modèle, nous avons commencé à tester des moyens de lutte originaux, chimique et/ou biologique.

Tests de moyens de lutte chimiques et/ou biologiques originaux

État de l'art

L'efficacité d'un traitement chimique en pulvérisation foliaire, associant un fongicide systémique phloémien élaboré au laboratoire selon une stratégie originale à un dérivé halogéné de l'acide salicylique (AS) susceptible de renforcer les défenses de la plante, a été évaluée à l'Université de Poitiers. Même si cette évaluation a été compliquée faute d'avoir un modèle fiable de contamination lors de la réalisation de ces essais, il ressort de cette étude que certains champignons impliqués dans les maladies du bois tels *Eutypa lata* peuvent être contenus par ce traitement, au moins sur le modèle bouture utilisé. L'efficacité observée est visiblement due à l'action du fongicide

systémique, les plantes traitées avec le dérivé de l'AS seul ayant un état sanitaire comparable aux plantes inoculées non traitées. Il n'en demeure pas moins que la piste de renforcement des défenses de la plante ne doit pas être abandonnée pour autant mais abordée de façon différente. Il est en effet possible que le dérivé de l'AS utilisé dans nos expériences soit compartimenté rapidement dans la plante et donc ne soit pas biodisponible.

La lutte biologique consiste en l'utilisation de micro-organismes afin de contrecarrer les effets délétères des parasites des plantes cultivées. Lors de travaux effectués à l'URCA chez la vigne, une bactérie (*Burkholderia phytofirmans*) a été inoculée à des vitro-

plants. Cette bactérie non pathogène colonise l'ensemble des organes de la plante et lui confère in vivo un fort niveau de protection contre *Botrytis cinerea*. L'effet protecteur de cette bactérie résulte d'une stimulation des défenses naturelles de la vigne, ce qui en fait un agent potentiellement utilisable contre les maladies du bois.

Développement de profongicides

Contrairement aux herbicides, aucun fongicide phloème-mobile (et donc capable d'être mobile dans la plante après pulvérisation foliaire) n'a jamais été mis au point par l'industrie phytosanitaire. Au sein du laboratoire de l'UP et pour lever ce verrou, nous avons imaginé et développé deux stratégies

novatrices pour atteindre un tel but : soit utiliser des composés acides pour mettre à profit le mécanisme dit de piégeage d'acide, soit coupler un fongicide à des nutriments pour alors utiliser la voie du transport actif. Ces stratégies ont été validées tout d'abord par la synthèse de composés répondant aux critères structuraux requis, puis par des tests sur des modèles simplifiés que nous avons mis au point, en particulier le modèle ricin. Nous nous plaçons maintenant dans l'optique de l'obtention de profongicides, à savoir des fongicides commerciaux modifiés en leur greffant un groupe conférant la mobilité selon les deux stratégies préalablement développées. Une fois à l'intérieur de la plante ou au contact du champignon parasite, ces profongicides doivent pouvoir être scindés par des enzymes (estérases, peptidases selon la structure considérée) pour libérer la matière active.

Pour l'instant, deux molécules modèles ont été obtenues en conjuguant un fongicide à un sucre ou à un aminoacide. Elles vont être maintenant évaluées sur différents points :

- leur activité *in vitro* sur les champignons responsables des maladies du bois ;
- leur capacité à pénétrer dans la plante et à s'y déplacer ;
- leur comportement de prodrogue que ce soit au niveau de la plante ou au niveau du champignon parasite ;
- leur efficacité sur des plantes contaminées selon le modèle mis au point à l'URCA.

Tests de confrontation

À l'issue des tests, nous avons observé que les molécules testées inhibaient la croissance des deux champignons testés, *D. seriata* et *N. parvum*, avec

un effet fongistatique, ceci dès les premiers jours de confrontation et à des concentrations faibles (de l'ordre du 10 μ M).

Les tests de confrontation de la bactérie avec les différents fongicides systémiques ont révélé que ces derniers n'avaient aucun effet délétère sur la croissance de la bactérie (tests réalisés en boîte de Pétri). Ce résultat positif nous a permis de tester *in planta* sans problème d'incompatibilité la combinaison d'un traitement biologique, la bactérisation, et d'un traitement chimique, l'application foliaire de fongicides systémiques.

Tests in planta à l'aide du modèle simplifié

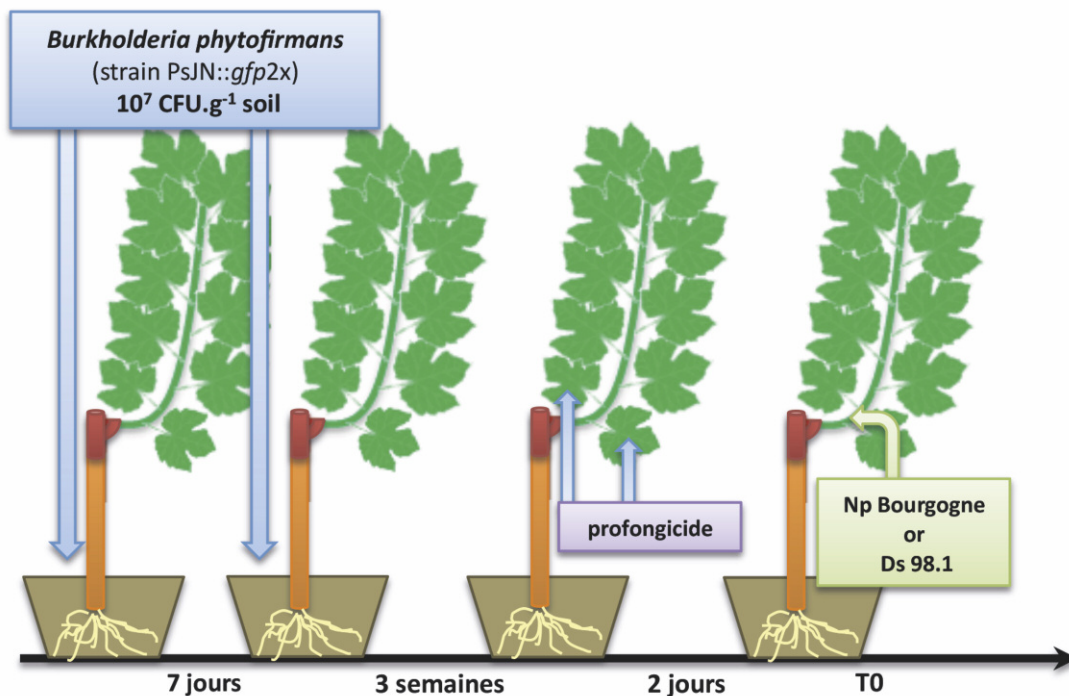
Le protocole actuellement testé est le suivant : des boutures âgées de 8 à 9 semaines sont bactérisées par un apport de l'inoculum bactérien dans 30 mL de PBS pour chaque pot de 250 g de terreau (une bouture par pot). Les boutures non bactérisées sont traitées avec 30 mL de PBS. Afin d'optimiser le maintien de l'inoculum bactérien, nous avons fait 2 apports de la bactérie à 107 CFU.g⁻¹ dans le sol puis à 108 CFU.g⁻¹ de sol, le second apport étant réalisé une semaine après le premier (voir la figure).

Le profongicide testé est appliqué à une concentration de 5mM au niveau des faces inférieure et supérieure des 2 feuilles situées au-dessus et en dessous du futur point d'inoculation du pathogène, soit au niveau du troisième entre-nœud (voir la figure). Afin d'optimiser la pénétration de la molécule, les feuilles traitées ont été badigeonnées 4 h avant par l'adjuvant Agral 90 (0,05%) à l'aide d'un pinceau.

Deux jours après le traitement avec le profongicide, les tiges sont infectées

avec *N. parvum* ou *D. seriata* (voir la figure). L'inoculation est faite au niveau du 3^e entre-nœud juste en dessous de la zone d'insertion de la feuille où les tissus conducteurs permettront de faire circuler le pathogène. À cet endroit, la surface des tiges est désinfectée à l'éthanol 70 %. La tige est blessée à l'emporte-pièce et un disque mycélien (3 mm de diamètre) (culture de 5 jours) est déposé. Du coton imbibé d'eau stérile puis du parafilm sont placés autour de la tige pour maintenir le disque fongique en condition humide et optimiser la colonisation de la plante par le champignon. Pour le témoin non infecté, un disque de milieu PDA est déposé sur la blessure. Pour vérifier la pénétration au niveau de la feuille et la diffusion *in planta* du profongicide jusqu'à l'apex de la plante par le flux phloémien, des feuilles sommitales ont été récoltées. Elles ont été immédiatement congelées dans de l'azote liquide puis stockées à - 80°C jusqu'à analyse.

Ces expérimentations sont actuellement en cours et les premiers résultats montrent que *N. parvum* entraîne la formation de nécroses plus importantes que *D. seriata*. Les champignons pathogènes ont été ré-isolés au niveau de la blessure dans 90 % des cas, ce qui confirme la corrélation entre la présence des champignons et le développement d'une nécrose. Au niveau des blessures réalisées chez les plantes témoins, aucun champignon, pathogène ou non, n'a été isolé. Les différences de taille des chancre induits par les pathogènes ne sont pas affectées en présence de la bactérie *B. phytofirmans* mais il semblerait y avoir un effet synergique du traitement associant *B. phytofirmans* / profongicide, notamment dans le cas de *N. parvum*.



Conclusions et Perspectives

D'autres nouvelles molécules doivent maintenant être produites en quantité substantielle pour étudier leur mobilité dans la plante et leur métabolisme, en particulier leur comportement comme prodroque. Il sera bien évidemment intéressant de comparer les facteurs de concentration dans la sève phloémienne pour mettre en exergue la stratégie qui permet une accumulation maximale de fongicide au sein de la plante. Ces nouvelles molécules seront ensuite évaluées quant à leur activité biologique pour lutter contre les Botryosphaeriaceés à l'aide du modèle simplifié. Il n'en demeure pas moins que ces molécules sont une étape intermédiaire qui nous

permet de progresser sur le plan fondamental et que nous visons l'obtention de molécules qui puissent libérer directement un fongicide commercial actif contre les pathogènes du BDA ou de l'esca.

Les expérimentations sur le modèle bouture doivent être répétées afin de confirmer l'effet synergique du co-traitement B. phytofirmans/profongicide. De même, les premières données obtenues sur le modèle bouture Chardonnay montrent une réponse différente de celle obtenue avec le Sauvignon, cet effet cépage devant être confirmé. Il est connu que ces deux cépages ont une sensibilité différente vis-à-vis de l'expression des maladies du bois. Une meilleure caractérisation de leur ré-

ponse suite à l'inoculation des pathogènes et à l'effet synergique ou non du profongicide et de B. phytofirmans nous permettra de mieux comprendre l'action des traitements afin d'améliorer leur positionnement en tant que traitement éliciteur/protecteur. Nous devons poursuivre la caractérisation du profongicide en tant que fongitoxique, mais aussi en tant que co-éliciteur combiné à l'effet éliciteur de B. phytofirmans. Ces effets protecteurs seront analysés notamment par le suivi de la taille des nécroses et le taux de réisolement des pathogènes tandis que l'effet éliciteur sera évalué par le suivi de l'expression de gènes spécifiques impliqués dans les réponses de défense de la plante.