

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

Jean-François Chollet
Université de Poitiers -
Faculté des Sciences Fondamentales
et Appliquées - IC2MP
jean.francois.chollet@univ-poitiers.fr

En quelques mots

Face à l'ampleur des pertes causées par les maladies du bois de la vigne et aux moyens de lutte très limités, notre projet a pour objectif de mettre au point un modèle simplifié pour tester de nouveaux moyens de lutte chimique et/ou biologique. 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. Nous

avons ensuite testé des moyens de lutte soit de nature biologique (application de la bactérie *B. phytofirmans* au sol), soit de nature chimique (application foliaire du fongicide ambimobile SM 26) ou encore une combinaison des deux. La bactérie ou le fongicide employés séparément n'ont pas montré d'efficacité significative alors que la combinaison des deux montre une nette réduction de la surface des nécroses, plus particulièrement sur le cépage sauvignon. Au

niveau des réponses de la plante, peu de modifications de l'expression des gènes étudiés sont observées sur sauvignon. En revanche, une induction de l'expression des gènes de défense lors d'un traitement soit avec SM 26, soit avec *B. phytofirmans* a été observée sur chardonnay par rapport aux plantes témoins. Ces inductions sont également observées de manière beaucoup plus prononcée lors du co-traitement SM 26 + *B. phytofirmans*.

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 and 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 inexistant. Trouver un produit de substitution à l'arsenic, un élément nécessaire à la vie cellulaire à très faible dose mais éminemment toxique aux concentra-

tions 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-pathogène 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 reproduisant 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 d'achever la mise au point d'un modèle de contamination fiable pour ensuite tester des moyens de lutte originaux, chimique et/ou biologique, ce second point correspondant évidemment à une attente forte des viticulteurs.

Résultats

Mise au point 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 moins virulente, *Diplodia seriata*) est maîtrisée et nous obtenons des nécroses dans le bois. Le protocole est le suivant :

(1) l'organe inoculé est la tige herbacée ; (2) 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 ; (3) l'obtention d'une nécrose est observée au bout d'un mois après infection ; (4) les champignons inoculés sont réisolés 1 mois et demi après l'inoculation. Actuellement, la taille

des nécroses induites suite à l'inoculation des pathogènes - plus particulièrement leur surface - est le principal indicateur utilisé et elle traduit l'agressivité des pathogènes et la réponse de la plante.

Nous avons ensuite utilisé ce modèle pour tester des moyens de lutte originaux, chimiques et/ou biologiques.

Tests de moyens de lutte chimiques et/ou biologiques originaux

Développement de nouveaux 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. Rappelons que l'objectif que nous recherchons est d'avoir une méthode qui permette de vectoriser une molécule active (fongicide, stimulateur de réactions de défense) pour l'amener au contact des champignons parasites à contrôler. 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.

Au cours de ce programme, nous avons pu synthétiser plusieurs nouveaux conjugués associant dans leur structure un fongicide de la famille des phénylpyrroles (le fenpiclonil, utilisé comme molécule modèle) et un acide aminé ou un sucre. Afin de faciliter l'interaction entre le nutriment et son transporteur, nous avons introduit un espaceur dont il convient d'étudier l'influence de la structure chimique sur le transport membranaire qui est la condition limitante essentielle pour obtenir des composés mobiles.

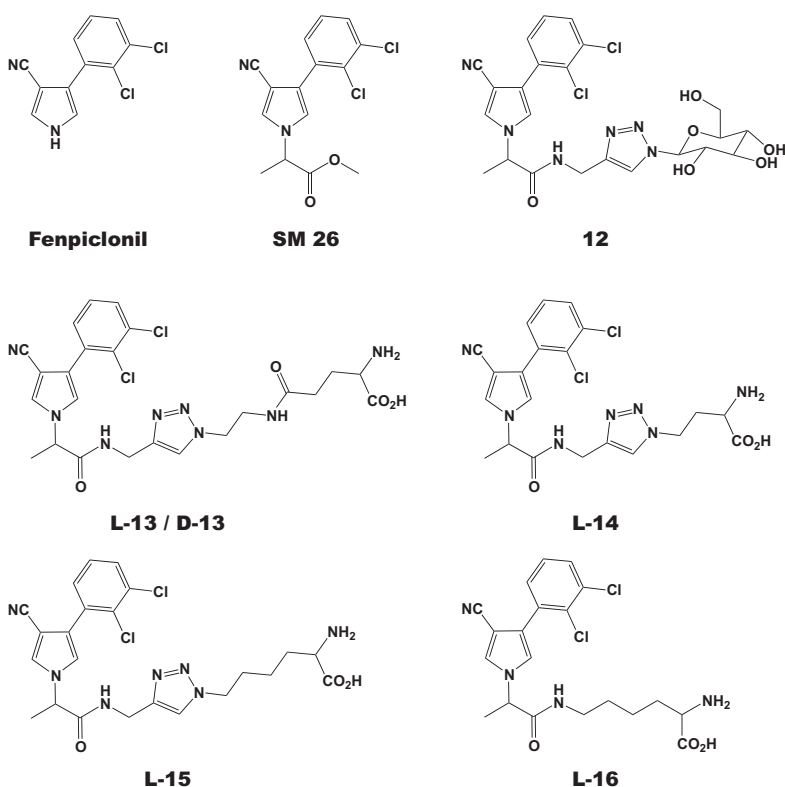


Figure 1 : Structures des principaux dérivés du fenpiclonil étudiés au cours de ce programme. Le dérivé 12 associe le fenpiclonil et le glucose par le biais d'un espaceur comprenant une fonction amide et un noyau 1,2,3-triazole. La structure des composés 13, 14, 15 et 16 comprend le fenpiclonil et une fonction α -aminoacide avec des espaceurs de natures variées. Ces derniers conjugués sont tous de la série L sauf le dérivé 13 qui a également été synthétisé sous la forme D.

Notre objectif a donc été ensuite de déterminer quel pouvait être le meilleur vecteur pour aller au contact des champignons à éradiquer. Les nombreux résultats engrangés nous permettent de dégager un certain nombre de points fondamentaux qui peuvent se résumer ainsi :

- les α -aminoacides sont des vecteurs plus efficaces que le glucose pour assurer la mobilité de molécules exogènes chez la plante ; ainsi, le conjugué avec le glucose que nous avons testé est retrouvé dans la sève phloémienne à une concentration 20 à 45 fois inférieure à un conjugué

comportant un aminoacide dans sa structure. Ceci est dû à une fixation réversible du conjugué avec le glucose sur un transporteur de saccharose, mais sans manipulation par la suite (Wu et al, 2017) ;

- les conjugués avec les α -aminoacides sont bien pris en charge par un système de transport actif ; ainsi, après 5 heures d'absorption, le même conjugué est retrouvé dans la sève phloémienne à une concentration 9 fois supérieure lorsqu'il est sous sa forme L (comme les α -aminoacides naturels) plutôt que sous sa forme D ;

- la nature de l'espaceur entre le fongicide et la fonction α -aminoacide influe sur la systémie ; en particulier, lorsqu'un cycle triazole est présent dans la structure, la réduction de la longueur de la chaîne du L-aminoacide augmente notablement la mobilité phloémienne (Marhadour et al, 2017);

- ce mécanisme de transport actif s'avère plus efficace que le mécanisme de piégeage d'acide car, contrairement à ce dernier, il est efficace sur toute l'échelle des pH biologiques.

Utilisation de la bactérie *Burkholderia phytofirmans* en lutte biologique

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 phy-*

tofirmans) a été inoculée à des vitoplants. 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 bac-

térie résulte d'une stimulation des défenses naturelles de la vigne, ce qui en fait un agent potentiellement utilisable contre les maladies du bois.

Test de la bactérie *B. phytofirmans* et du profongicide SM 26 utilisés seuls ou en combinaison

Le protocole appliqué a été le suivant (Fig. 2) : des boutures âgées de 8 à 9 semaines sont bactérisées par un apport de l'inoculum bactérien dans 30 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) 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 (Colony-Forming Unit) dans le sol puis à 108 CFU.g⁻¹ de sol, le second apport étant réalisé une semaine après le premier.

Le profongicide testé est appliqué à une concentration de 5 mM 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. Afin d'optimiser la pénétration de la molécule, les feuilles traitées ont été badigeonnées 4 h avant par l'adjuvant Agral 90 (0,05%).

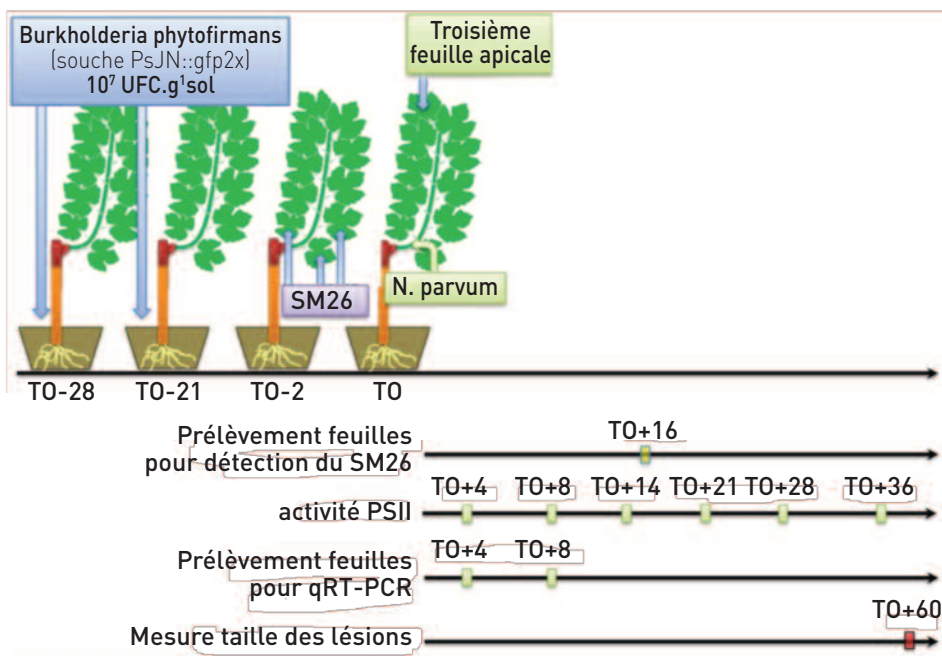


Figure 2 : Déroulement dans le temps des différentes phases de l'expérimentation des effets combinés de la bactérie *B. phytofirmans* et du dérivé du fénpiclonil SM 26

Deux jours après le traitement avec le profongicide, les tiges sont infectées avec *N. parvum*. L'inoculation est faite au niveau du 3^e entre-nœud. 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 est placé 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 (Potato Dextrose Agar) est déposé sur la blessure.

Un suivi de la taille des nécroses induites (Fig. 3) ainsi que celui de certaines réponses de la plante par analyse transcriptomique ont été réalisés afin de préciser le mode d'action de cette association "bactérie + fongicide". Les principaux résultats sont :

- in vitro, le profongicide n'affecte pas la croissance de la bactérie.
- in planta, la bactérie se maintient au niveau du système racinaire et

des analyses pour quantifier SM 26 dans la partie aérienne (feuille) sont en cours afin de valider sa systémie chez la vigne et de la quantifier.

- la bactérie ou le fongicide employés séparément n'ont pas montré d'efficacité significative alors que la combinaison des deux montre une nette réduction de la surface des nécroses (Fig. 3), plus particulièrement sur le cépage sauvignon où les surfaces des nécroses des plantes traitées sont comparables à celles des plantes n'ayant pas été contaminées. Cet effet bénéfique a été noté lors de deux essais annuels consécutifs.
- sur chardonnay, une induction de l'expression des gènes de défense lors d'un traitement soit avec SM 26, soit avec *B. phytofirmans* a été observée par rapport aux plantes témoins (non inoculées par le pathogène *N. parvum*). Ces inductions sont également observées de manière beaucoup plus prononcée lors du co-traitement SM 26 + *B. phyto-*

firmans. En présence de *N. parvum* seul (sans traitement), l'expression de la majorité des gènes est également induite et, comme précédemment, de plus fortes inductions sont ensuite notées lors du co-traitement SM 26 + *B. phytofirmans*.

- sur sauvignon et comparativement à ce qui a été observé sur chardonnay, peu de gènes ont une expression induite par SM 26 ou *B. phytofirmans*, mais toutefois l'effet synergique du co-traitement semble être présent en l'absence de *N. parvum*. En présence de *N. parvum*, ces tendances ne sont pas observées. Il faut toutefois rappeler que les prélèvements ont été faits 4 jours après la contamination et que compte tenu de l'effet biologique marqué observé sur sauvignon, il est possible d'imaginer que l'induction des réactions de défense est plus longue à se mettre en place pour ce cépage. Des réponses différentes selon les cépages ont déjà été observées (Spagnolo et al. 2014).

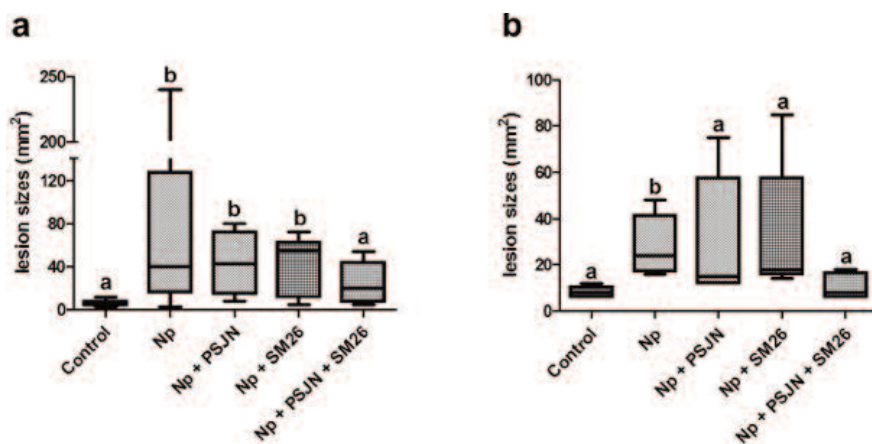


Figure 3 : Taille moyenne des lésions 60 jours après la contamination artificielle avec *N. parvum* Bourgogne chez le Chardonnay (a) et le Sauvignon (b). Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes. PSJN : *B. Phytofirmans* souche PSJN

Conclusion et perspectives

La combinaison "profongicide SM 26 + bactérie" semble donc prometteuse et la compréhension de son mode d'action doit se poursuivre afin d'optimiser son application. Il sera aussi nécessaire de tester les nouveaux conjugués dérivés d'acides aminés afin

de voir s'ils peuvent améliorer l'effet biologique observé avec SM 26 en association avec la bactérie. Les résultats obtenus au cours de ce programme confirment une hypothèse que nous avons faite précédemment, à savoir que l'activation des mécanismes de défense des plantes peut vraisemblablement

permettre de contrôler, tout au moins de contenir les maladies du bois chez la vigne. Nous envisageons donc d'appliquer ce protocole à des essais de plein champ, mais aussi de développer de nouveaux produits mobiles dans la plante, susceptibles d'activer ses réactions de défense.