



La recherche vous parle...
13 janvier 2012



Contribution à la lutte contre les maladies du bois chez la vigne : vers de nouvelles stratégies de traitements chimiques

Jean-François Chollet
Françoise Rocher



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- **ESCA :** *Phaeomoniella chlamydospora*
Phaeoacremonium aleophilum
Fomitiporia mediterranea
Eutypa lata
...
- **Eutypiose :** *Eutypa lata*
- **BDA :** *Neofusicoccum parvum*
Botryosphaeria spp. (obtusa, ...)

Le syndrome esca chez la vigne



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Forme lente

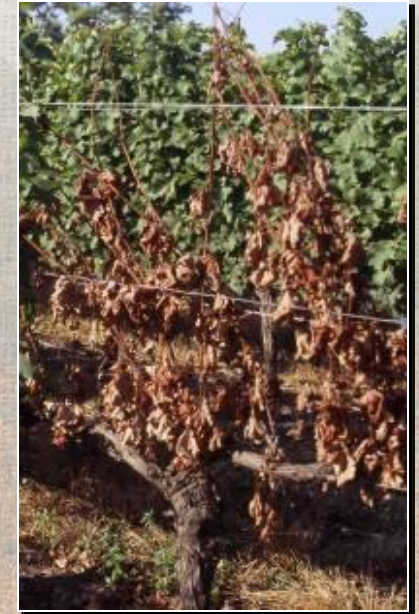


Cabernet-Sauvignon



(© P. Larignon)

Apoplexie du cep



(© P. Larignon)



Sauvignon



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

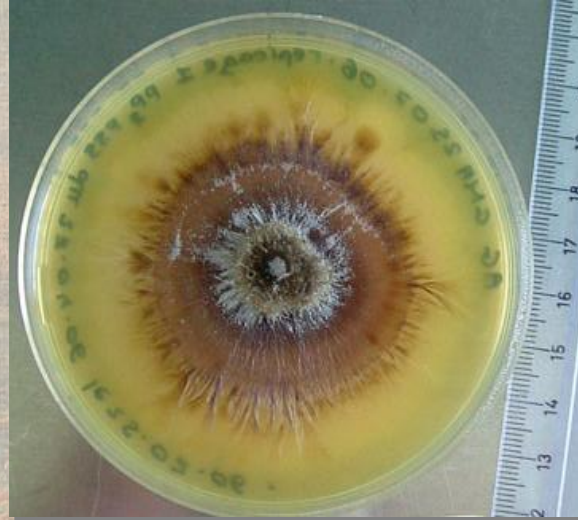
Phaeomoniella chlamydospora

PP1S936 (P. Larignon)



Phaeoacremonium aleophilum

PP2F55 (P. Larignon)



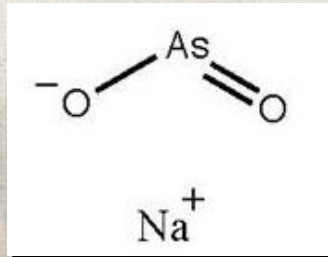
LR 112 (J.-P. Péros)






La recherche vous parle...
13 janvier 2012

✓ L'arsénite de sodium (CAS 7784-46-5)



- Interdit depuis Nov. 2001
- Agent cancérigène 
- DL50 : 150 mg/kg (voie percutanée)

✓ Moyens prophylactiques : limiter la pression d'infection.



- L'inoculum (sarments, bras et souches mortes)
- Les plaies (vigueur, taille d'hiver, protection des plaies)
- Repérage & diagnostic

La taille de la vigne : miniatiure du XIIIe.
Escorial, bibliothèque royale (Espagne)
(© mboullic.club.fr)



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- La recherche fondamentale :
 - ✓ cycle biologique des espèces fongiques
 - ✓ mécanismes infectieux
 - ✓ antagonistes des pathogènes
 - ✓ réponse de la vigne
- La recherche appliquée :
 - ✓ traitement des plaies de taille
 - ✓ injection dans le cep



(© ITV France)

E. lata et *G. roseum*



Sécateur à pulvérisateur
(© Felco)



Tree injector
(© Sidewinter)

Le problème posé :



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

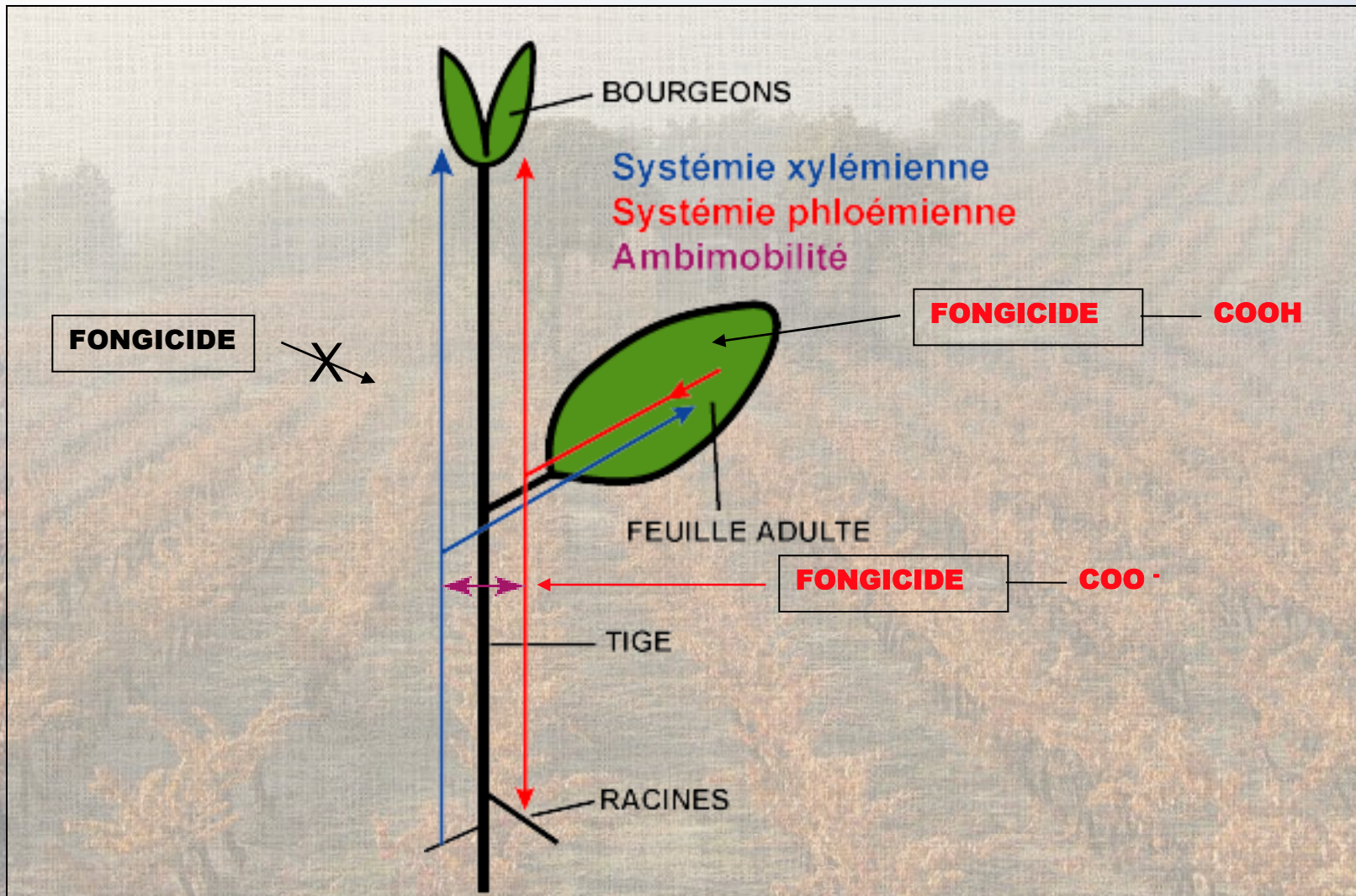
Peut-on lutter contre les champignons pathogènes responsables des maladies du bois par pulvérisation foliaire ?



La stratégie que nous développons



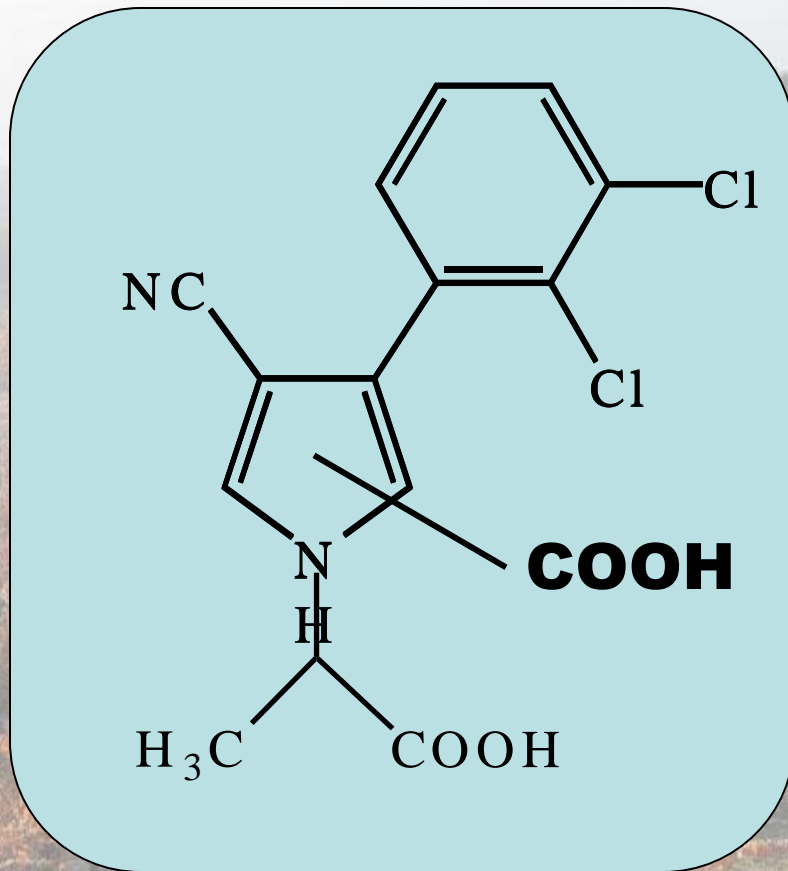
La recherche vous parle...
13 janvier 2012



La famille modèle retenue : les phénylpyrroles



La recherche vous parle...
13 janvier 2012



Le composé retenu « F30 » a, d'une part, montré *in vitro* une activité fongicide sur certains champignons (*Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*) et d'autre part, sa mobilité dans la plante a été confirmée (mécanisme de piégeage d'acide)

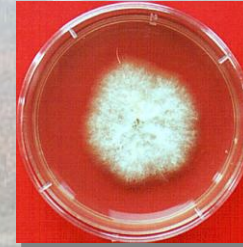
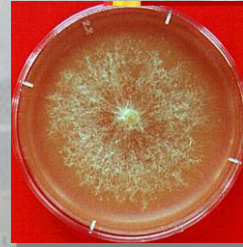
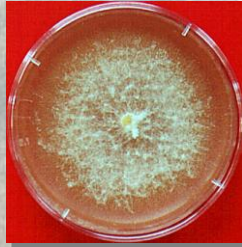
Efficacité *in vitro* de F30 sur *Eutypa lata*



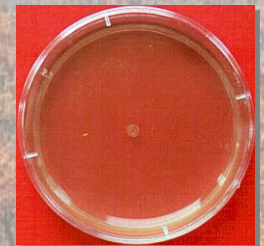
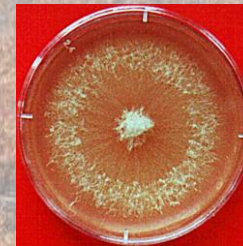
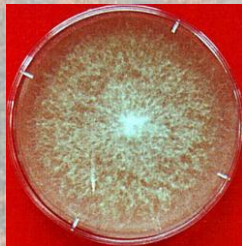
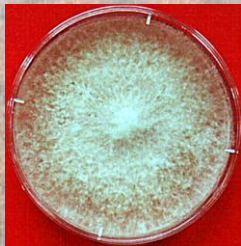
La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Croissance de *Eutypa lata* au bout de 21 jours

Fenpiclonil



Dérivé F30



0 μ M

1 μ M

10 μ M

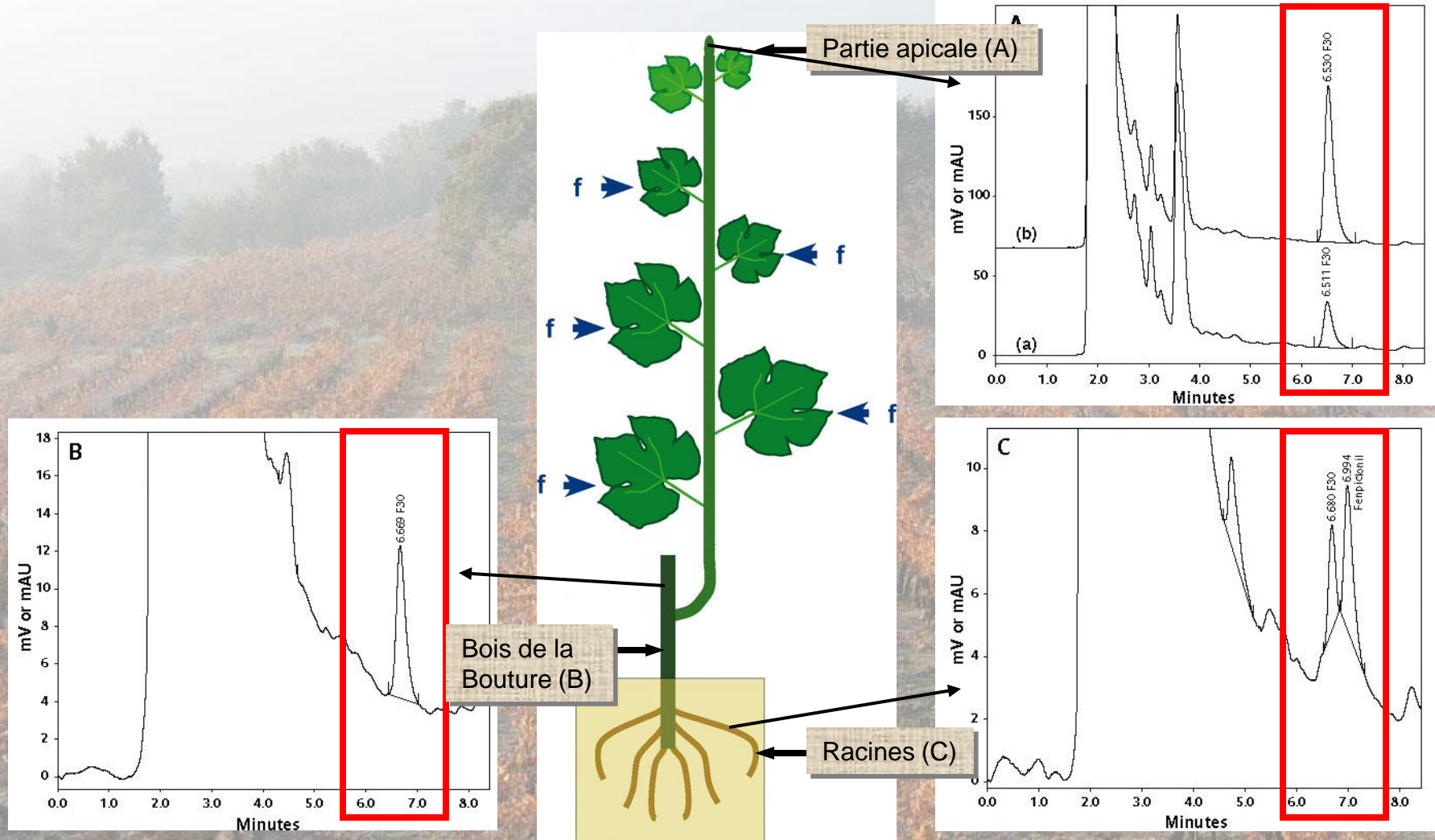
50 μ M

1 mM

La lutte chimique : Mobilité de F30 chez la vigne



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

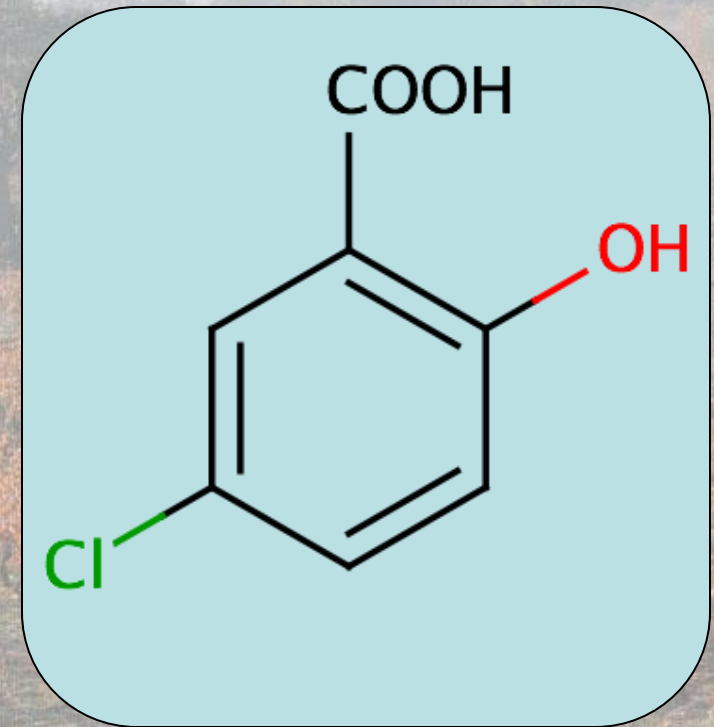


La stimulation des défenses de la plante : une stratégie complémentaire à envisager



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Compte tenu de la complexité du problème, nous proposons d'associer à une action fongicide classique, un renforcement des défenses de la plante. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'acide salicylique (AS) et à ses dérivés halogénés. L'AS est une molécule qui intervient dans le système de défense de la plante lorsque celle-ci est agressée. Certains dérivés halogénés sont connus comme étant plus efficaces que l'AS lui-même.



Les mécanismes de transport de l'acide salicylique chez les plantes ont été précisés



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

• L'acide salicylique et ses dérivés halogénés pénètrent dans la sève phloémienne après application foliaire grâce à un transporteur membranaire en complément du mécanisme de piégeage d'acide

• Ces résultats fondamentaux importants, notamment pour notre projet, ont été publiés dans une revue majeure de physiologie végétale (Plant Physiology 2009, vol. 150, 2081-2091)

Salicylic Acid Transport in *Ricinus communis* Involves a pH-Dependent Carrier System in Addition to Diffusion^{1[OA]}

Françoise Rocher², Jean-François Chollet², Sandrine Legros, Cyril Jousse, Rémi Lemoine, Mireille Faucher, Daniel R. Bush, and Jean-Louis Bonnemain*

Laboratoire Synthèse et Réactivité des Substances Naturelles, Université de Poitiers, UMR CNRS 6514, F-86022 Poitiers cedex, France (F.R., J.-F.C., S.L., C.J.); Laboratoire Physiologie Moléculaire du Transport des Sucres chez les Végétaux, Université de Poitiers, FRE CNRS 3091, F-86022 Poitiers cedex, France (C.J., R.L., M.F., J.-L.B.); and Department of Biology, Program in Molecular Plant Biology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523 (D.R.B.)

Despite its important functions in plant physiology and defense, the membrane transport mechanism of salicylic acid (SA) is poorly documented due to the general assumption that SA is taken up by plant cells via the ion trap mechanism. Using *Ricinus communis* seedlings and modeling tools (ACD LogD and Vega ZZ softwares), we show that phloem accumulation of SA and hydroxylated analogs is completely uncorrelated with the physicochemical parameters suitable for diffusion (number of hydrogen bond donors, polar surface area, and, especially, LogD values at apoplastic pHs and Δ LogD between apoplast and phloem sap pH values). These and other data (such as accumulation in phloem sap of the poorly permeant dissociated form of monohalogen derivatives from apoplast and inhibition of SA transport by the thiol reagent *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid [pCMBS]) lead to the following conclusions. As in intestinal cells, SA transport in *Ricinus* involves a pH-dependent carrier system sensitive to pCMBS; this carrier can translocate monohalogen analogs in the anionic form; the efficiency of phloem transport of hydroxylated benzoic acid derivatives is tightly dependent on the position of the hydroxyl group on the aromatic ring (SA corresponds to the optimal position) but moderately affected by halogen addition in position 5, which is known to increase plant defense. Furthermore, combining time-course experiments and pCMBS used as a tool, we give information about the localization of the SA carrier. SA uptake by epidermal cells (i.e. the step preceding the symplastic transport to veins) insensitive to pCMBS occurs via the ion-trap mechanism, whereas apoplastic vein loading involves a carrier-mediated mechanism (which is targeted by pCMBS) in addition to diffusion.



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Compte tenu de la complexité du problème, nous avons essayé de simplifier le plus possible de façon à bien cerner ce qui « fonctionne » et ce qui ne « fonctionne pas » :

- **Les essais sont effectués sur un seul cépage, connu comme ayant une grande sensibilité à l'ESCA : le sauvignon (nous l'avons déjà utilisé par ailleurs)**
- **Nous avons travaillé soit sur boutures cultivées en serre en culture hydroponique, soit sur greffes d'un an cultivées en plein air dans un mélange terre-terreau**
- **Les champignons sont inoculés séparément la plupart du temps**



La recherche vous parle...
13 janvier 2012



**Bouture à 2
yeux sur pain de
laine de roche**

**Greffes sauvignon sur SO4 en
conteneurs**





La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- Quatre espèces majeures de champignons impliqués dans les maladies du bois ont été retenues :
 - *Eutypa lata*, EL
 - *Neofusicoccum parvum*, NP
 - *Phaeomoniella chlamidospora*, Pch
 - *Phaeoacremonium aleophilum*, Pal
- Les souches ont été fournies par P. Larignon (ITV Nîmes)
- L'inoculation se fait sous l'œil supérieur pour les boutures et au niveau du greffon pour les plantes greffées.



La recherche vous parle...
13 janvier 2012



**Perçage sous l'œil
inférieur jusqu'à la moelle**



**Prélèvement d'un disque
de mycélium**



Implantation du mycélium



**Rebouchage avec un coton
puis de la paraffine**

Observation du développement de différentes souches dans le bois



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- Certaines boutures inoculées mais n'ayant pas débourré sont disséquées après 2 mois afin d'observer le développement de différentes souches dans le bois



Neofusicoccum parvum : nécroses importantes dans tout le bois, progressant dans les 2 sens mais surtout vers le haut

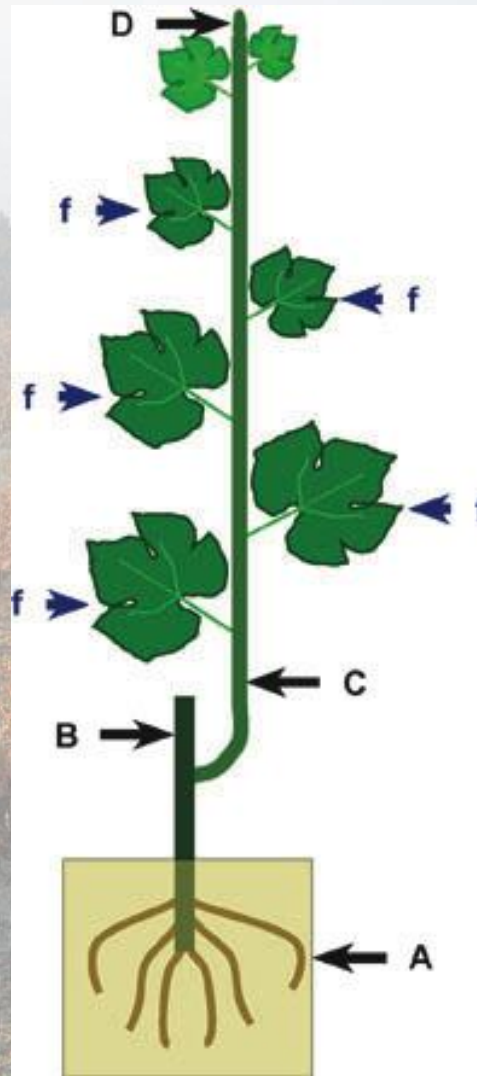


Phaemoniella chlamydospora : nécroses sectorielles bidirectionnelles avec des ponctuations caractéristiques (coupe transversale)



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- La bouture initiale (B) a développé un système racinaire (A) et un rameau feuillé (C). Les feuilles matures (f) sont badigeonnées au pinceau de F30 5 mM et d'acide 5-chlorosalicylique 5 mM. La zone apicale (D) n'est pas traitée.



Protocole des traitements effectués : les boutures



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- Application d'Agral 90 à 0,05 % le matin de chaque traitement
- Application des traitements l'après-midi par badigeonnage au pinceau des 2 côtés des feuilles matures :
 - F30 5mM + Agral 0,05 % puis, après 1 h de séchage,
 - 5CISA 5mM + Agral 0,05 %
- Nous avons d'emblée adopté des doses élevées, mais celles-ci ne présentent aucune phytotoxicité, voire même stimulent la croissance des plantes
- 7 traitements ont été effectués en 2009 (année n) : 6 , 20 et 30 juillet, 24 août, 8 et 23 septembre et 7 octobre.
- 3 traitements ont été effectués en 2010 (année n + 1) : 2 et 24 août, 9 septembre
- Quelques traitements sont faits à distance pour les maladies classiques de la vigne (myclobutanil + mancozèbe)



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- Une observation visuelle avec notation de l'état sanitaire des plantes a été effectuée au printemps de la deuxième année ($n + 1$), avant d'effectuer une nouvelle série de traitements



- **En examinant visuellement les les boutures cultivées en serre au printemps de l'année n + 1, 2 cas sont à distinguer :**
 - i/ les plantes inoculées avec *Phaeomoniella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum* (champignons à croissance lente), seuls ou ensembles, ne présentent pas de symptômes aériens et pas de différences entre plantes traitées et témoins.
 - ii/ les plantes inoculées avec *Eutypa lata* et *Neofusicoccum parvum* (champignons à croissance rapide) présentent des symptômes parfois très marqués sur les parties aériennes pouvant aller jusqu'à la mort de la plante. On observe une différence entre les plantes traitées et les plantes témoins.



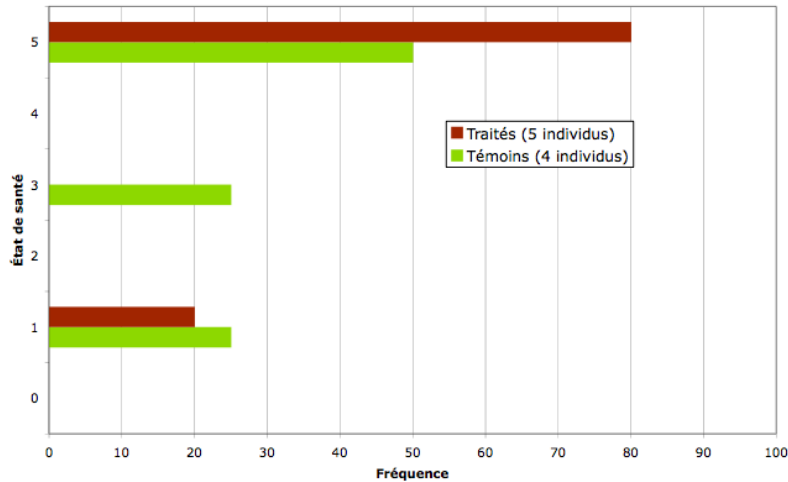
La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- La notation adoptée est la suivante :
 - 0 : plante morte, aucun bourgeon ou feuille chlorophyllienne
 - 1 : présence de rameaux très courts (< 15 cm)
 - 2 : rameaux de 15 à 35 cm, frêles
 - 3 : rameaux de 35 à 65 cm
 - 4 : rameaux > 65 cm
 - 5 : rameaux > 65 cm et diamètre de la base > 6 mm
- Les graphiques qui suivent indiquent une fréquence pour chaque état sanitaire soit le rapport du nombre d'individus à l'état N (de 0 à 5) / nombre total d'individus

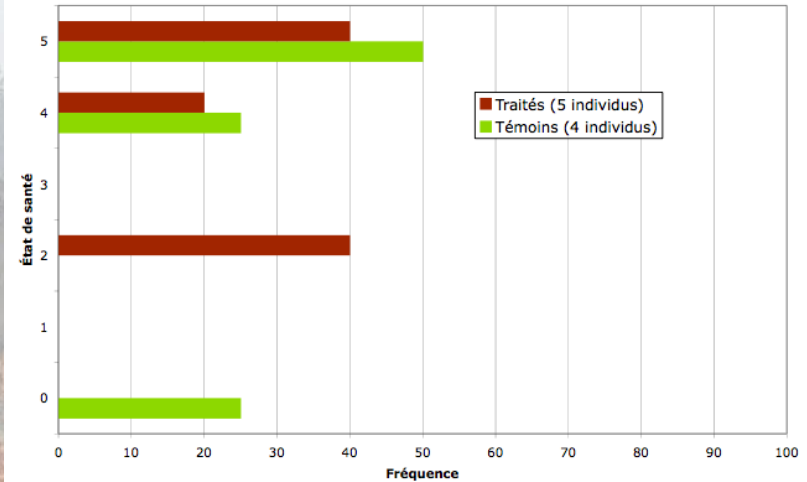


La recherche vous parle...
13 janvier 2012

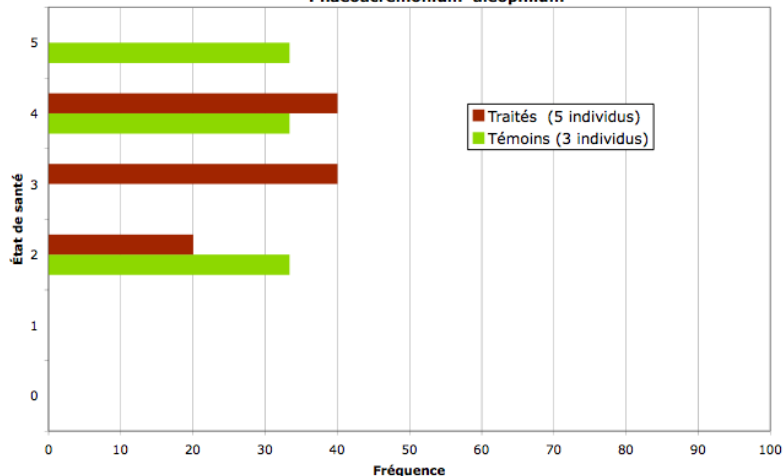
Phaeoconiella chlamydospora



Phaeoacremonium aleophilum



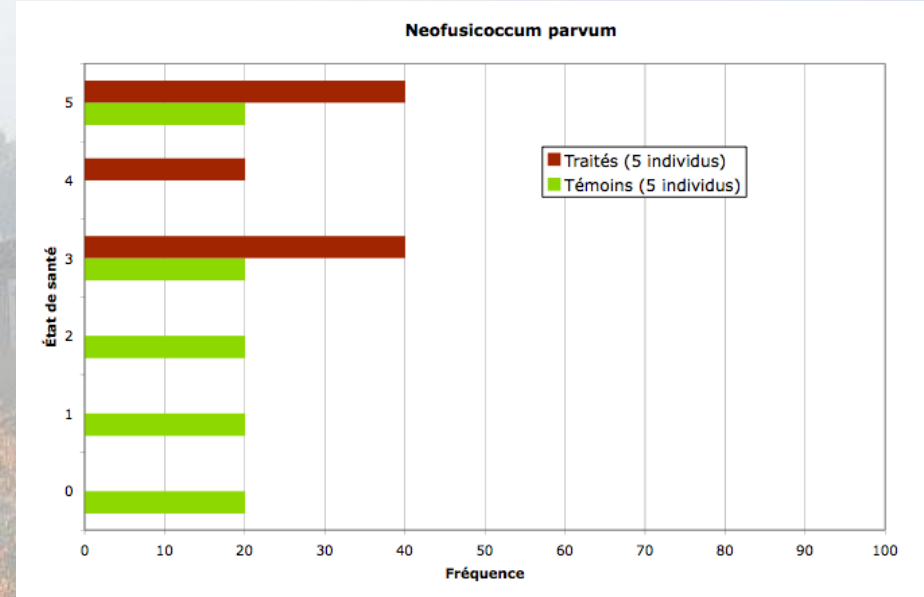
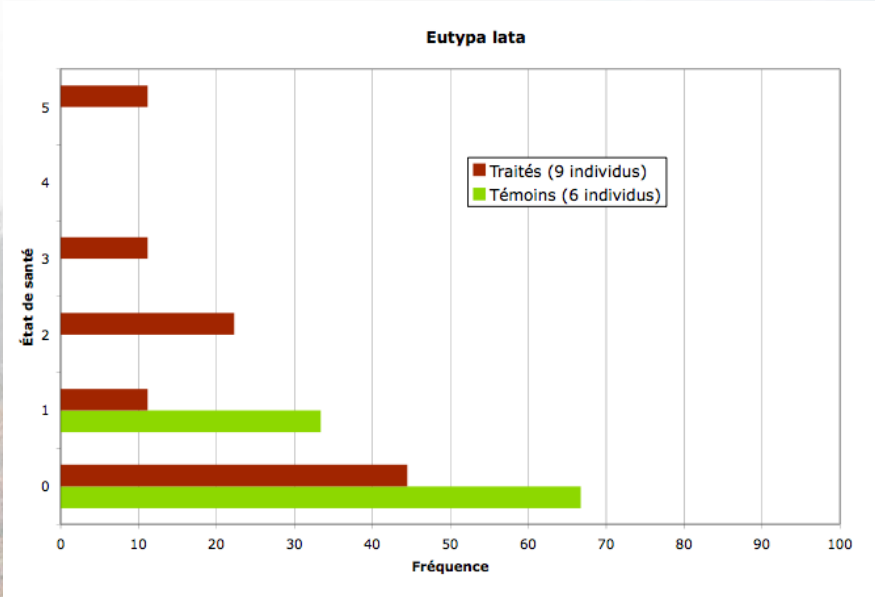
Phaeoconiella chlamydospora
Phaeoacremonium aleophilum



- Chez les plantes inoculées avec Pal, Pch ou Pal + Pch (mycélium à croissance lente), aucune différence significative n'apparaît entre les plantes traitées (en rouge) et les plantes non traitées (en vert).
- Cela ne signifie pas qu'il n'y a pas d'effet du traitement, mais que visuellement aucune différence n'apparaît.



La recherche vous parle...
13 janvier 2012



- Chez les plantes inoculées avec Ei (mycélium à croissance rapide), la majorité des individus non traités (en vert) est morte (4/6) et les 2 plantes restantes sont très malades (1 est morte après cette notation). Chez les plantes traitées, 5 plantes sur 9 sont dans un état critique (0 et 1) tandis que les 4 autres plantes sont dans un état sanitaire satisfaisant (2 à 5). Il faut noter que la souche d'Ei utilisée est particulièrement virulente.
- Chez les plantes inoculées avec Np (mycélium à croissance rapide), la population témoin (en vert) est distribuée régulièrement sur l'échelle de l'état sanitaire. Ce n'est pas le cas de la population traitée (en rouge) dont la notation est comprise entre 3 et 5. Son état sanitaire est donc meilleur.



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

. Puis, après une nouvelle série de traitements lors de l'année $n + 1$, pour évaluer l'efficacité de ces traitements effectués sur une période de 2 années, les plantes bouturées ont été disséquées au printemps de la 3^e année ($n + 2$) afin d'observer le développement ou pas de nécroses caractéristiques et de tenter un réisolement du champignon sur milieu de culture



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Exemple de plante témoin non traitée



Notes :

Bien enraciné
Pas de rameau 2010 - seulement des feuilles
Longueur du rameau 2009 : 80 mm
Section du rameau vermoulue - nécrosée sur 21 mm (jusqu'au 1er nœud) avec un tout petit secteur sain.

Coupe longitudinale : nécrose d'un nœud à l'autre (-45 + 30 mm)

Note de l'état de santé été 2010 : 1

Note de l'état de santé novembre 2010 : 0

Sections transversales

sous le point de contamination

au-dessus du point de contamination



Eutypa lata
contamination en avril

témoin

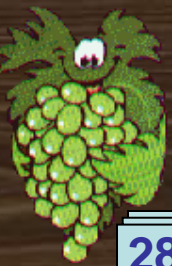
rep 4

N°29



Section longitudinale

Section du rameau



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Exemple de plante traitée vivante



Notes :

Bien enraciné - point de contamination presque perpendiculaire au rameau.
Longueur rameau 2009 : 6 cm, rameau 2010 : + de 100 cm

Coupe longitudinale : fines nécroses d'une nœud à l'autre avec une nécrose épaisse sur ± 5 mm

Coupes transversales : observations de points bruns au-dessus la contamination .
Points bruns et noirs au -dessous.

Note de l'état de santé été 2010 : 3

Sections transversales

sous le point de contamination

au-dessus du point de contamination



Eutypa lata
contamination en juillet

traité rep 3 N°41



Section longitudinale

Section du rameau



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

**Exemple
de plante
témoin
non traitée**



Figure 24: Bois d'une vigne témoin contaminée par *Neofusicoccum parvum*. A - Coupes transversales de la partie inférieure du bois de bouture. B - Coupe longitudinale. C - La section du rameau latéral (pousse de l'année n) présente un point de nécrose qui parcourt tout le rameau. D - Sections transversales de la partie supérieure du bois. Échelle graduée au 1/2 mm sur un support quadrillé par 3 cm.



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Exemple de
plante
traitée
vivante

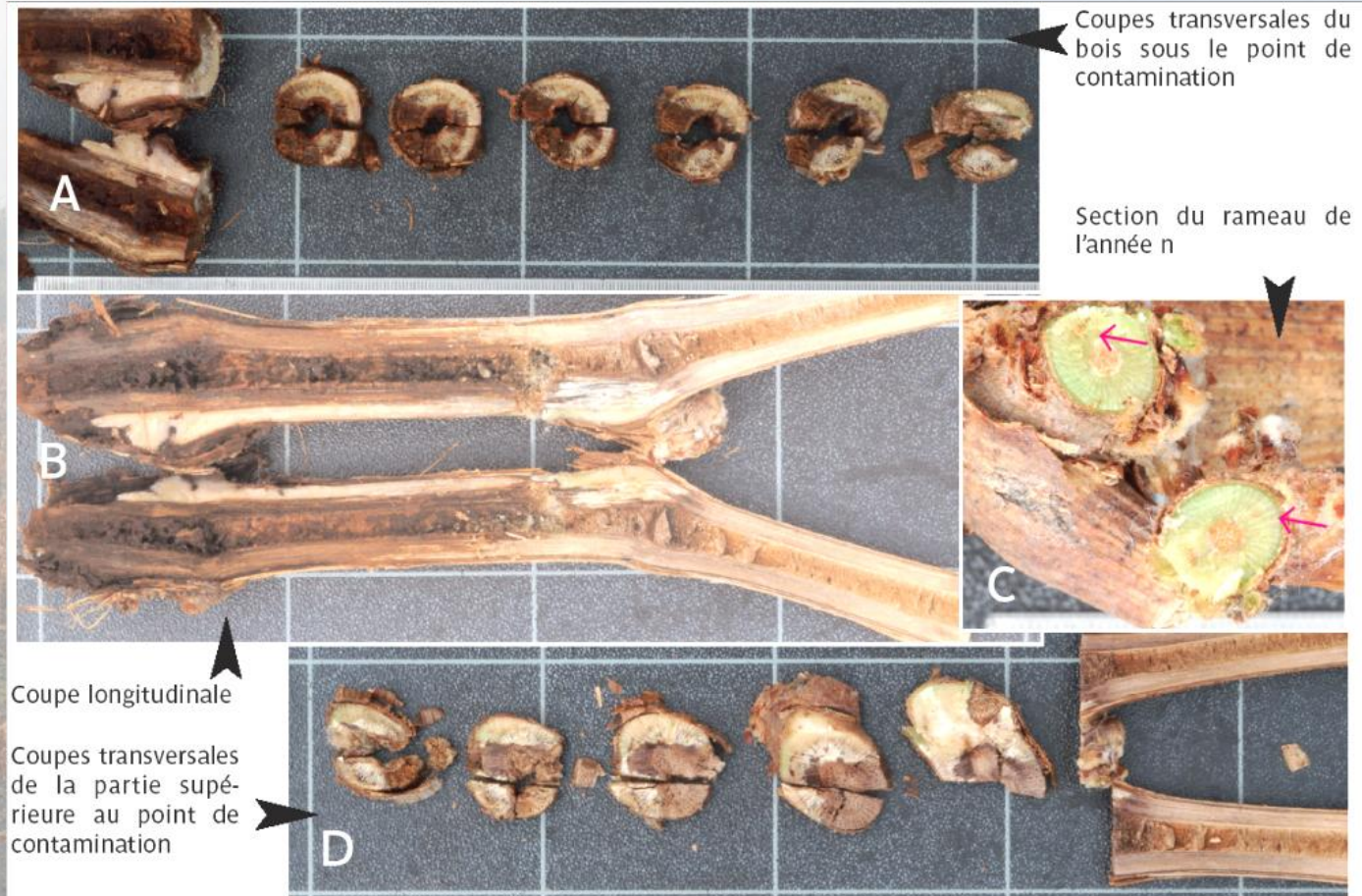


Figure 25: Bois d'une vigne traitée contaminée par *Neofusicoccum parvum*. A - Coupes transversales de la partie inférieure du bois de bouture portant 1/3 de surface nécrosée. B - Coupe longitudinale. C - La section du rameau latéral (pousse de l'année n) présente une strie rouge indiquée par la flèche qui se prolonge sur seulement 5 mm. D - Sections transversales de la partie supérieure du bois portant également une nécrose sur un tiers de la surface. Échelle graduée au 1/2 mm sur un support quadrillé par 3 cm.



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Comparaison des taux de mortalité et de l'état sanitaire du rameau latéral (année n) entre des plantes contaminées artificiellement (année n) non traitées (témoins) ou traitées (5CISA + F 30)

Champignon	Taux de mortalité		Taux de boutures portant un rameau sain	
	Plantes témoins	Plantes traitées	Plantes témoins	Plantes traitées
<i>Eutypa lata</i>	83 %	55 %	17 %	33 %
<i>Neofusicoccum parvum</i>	20 %	0 %	40 %	80 %
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	40 %	0 %	40 %	100 %
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	33 %	0 %	67 %	100 %
<i>Pal + Pch</i>	0 %	0 %	100 %	60 %



- **Pour la suite, plusieurs points sont à confirmer ou éclaircir :**
 - pour les essais de plein air, l'efficacité des traitements sera évaluée idéalement par PCR (??), sinon par dissection et examen des nécroses
 - pour les essais en serre, il est important de vérifier :
 - i/ si les résultats encourageants obtenus sont reproductibles sur un plus grand nombre de plantes (boutures printemps 2011, en cours)
 - ii/ si l'effet est dû à F30, au 5CISA ou à la synergie des 2 produits utilisés ensemble

D'autres stratégies commencent à être explorées...



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- Nous avons vu que des boutures pouvaient être très rapidement envahies par *Neofusicoccum parvum* (Np), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch) ou *Eutypa lata* (El). Ceci confirme des observations déjà faites (Ph. Larignon) et pose notamment le problème de la contamination via la pépinière.
- En complément à nos travaux actuels, nous avons initié un programme en vue de l'obtention de plants sains en sortie de pépinière. Il a été clairement établi qu'à l'arrivée en pépinière, *Pch*, *Pal*, *Botryosphaeria obtusa* et *Np* étaient des champignons couramment retrouvés et qu'ils se trouvaient quasiment toujours en surface du matériel végétal. Par la suite et notamment après le processus de stratification, ces champignons se développent fortement et sont isolés dans une partie des greffons qui vont être mis en vente.



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- L'idée est d'utiliser des fongicides commerciaux actifs *in vitro* contre différents champignons responsables des maladies du bois afin d'empêcher ou de limiter leur développement lors du processus de stratification ou au moment de la plantation**

Tableau 5: Effet fongicide de spécialités commerciales testées sur *Eutypa lata*, *Neofusicoccum parvum* et *Phaeomoniella chlamydospora* (F : effet fongicide - f: effet fongistatique- o: pas d'effet d'intérêt)

Spécialité commerciale	Concentration en matière(s) active(s)	Efficacité sur <i>Eutypa lata</i>	Efficacité sur <i>Neofusicoccum parvum</i>	Efficacité sur <i>Phaeomoniella ch.</i>
Opus[®] Époxiconazole 125 g/l	0,1 mM	F	o	F
	0,5 mM	F	o	F
	1 mM	F	o	F
Topaze[®] Penconazole 100 g/l	0,1 mM	F	o	F
	0,5 mM	F	F	F
	1 mM	F	F	F
Polyflor[®] Propiconazole 5 g/l	0,1 mM	F	f	F
Polyscore[®] Difénoconazole 250 g/l	0,1 mM	F	o	F
	0,5 mM	F	o	F
	1 mM	F	o	F
Ortiva[®] Azoxystrobine 250 g/l	0,1 mM	o	o	o
	0,5 mM	o	o	o
	1 mM	o	o	o
Cabestor[®] Propiconazole 250 g/l + Tébuconazole 250 g/l	0,1 mM	F	f	F
	0,5 mM	F	F	F
	1 mM	F	F	F
Botryl[®] Cyprodinil 375 g/kg + Fludioxonil 250 g/kg	0,1 mM	o	o	F
	0,5 mM	f	o	F
	1 mM	f	o	F



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- **Un premier test a été effectué en stratification avec un mélange d'époxiconazole et d'acide 5-chlorosalicylique à diverses concentrations. Il s'est avéré après la stratification que l'enracinement ne s'est pas produit pour les modalités A et B (doses les plus élevées) et que malgré un débouillage à peu près normal pour la modalité C, les bois porte-greffe sont ensuite devenus noirs.**
- **Auquel des 2 produits attribuer cette phytotoxicité ?**

Tableau 6: modalités testées au cours de la stratification en pépinière en 2009

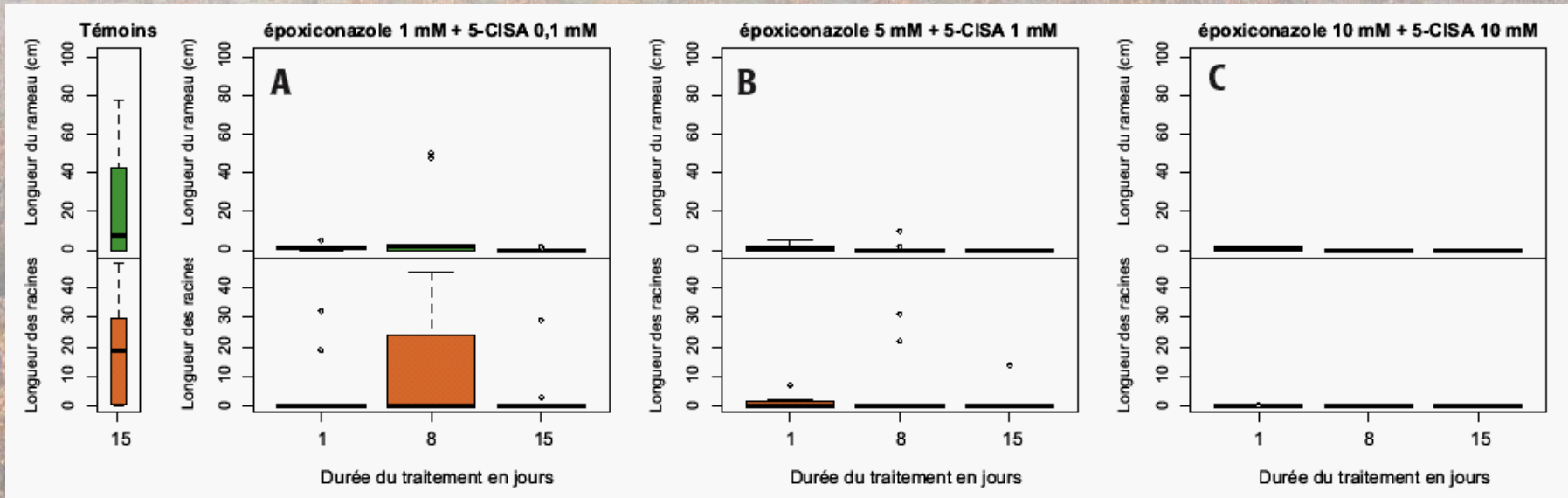
Modalité A	époxiconazole 1 mM + 5-CISA 0,1 mM
Modalité B	époxiconazole 5 mM + 5-CISA 1 mM
Modalité C	époxiconazole 10 mM + 5-CISA 10 mM

D'autres stratégies commencent à être explorées...



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

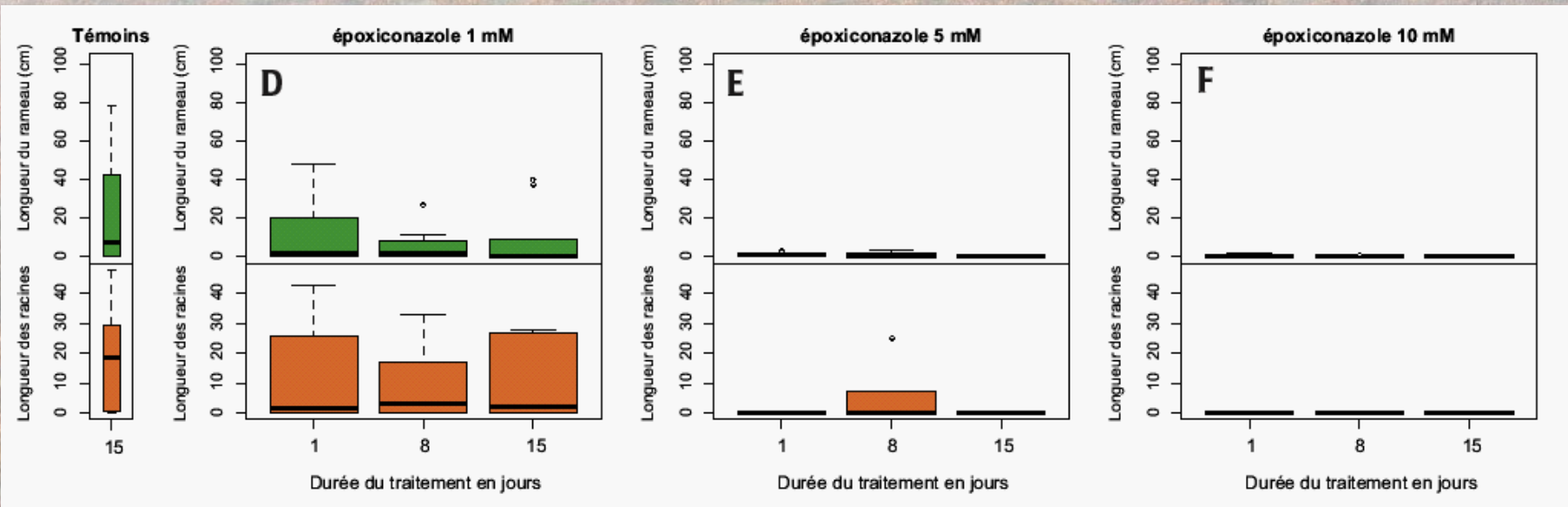
- Nous avons alors reproduit cette expérience en laboratoire pour apporter des éléments de réponse quant à cette phytotoxicité. Pour ceci, nous avons travaillé sur un modèle simple (boutures à 2 yeux), en mimant les conditions d'une stratification de plantes greffées dans le but de voir l'impact des différentes molécules sur la rhizogenèse notamment.
- Quelque soit la durée du traitement et les concentrations en produits, le mélange Époxiconazole + 5CISA s'avère très phytotoxique : racines et rameaux ne poussent pas





La recherche vous parle...
13 janvier 2012

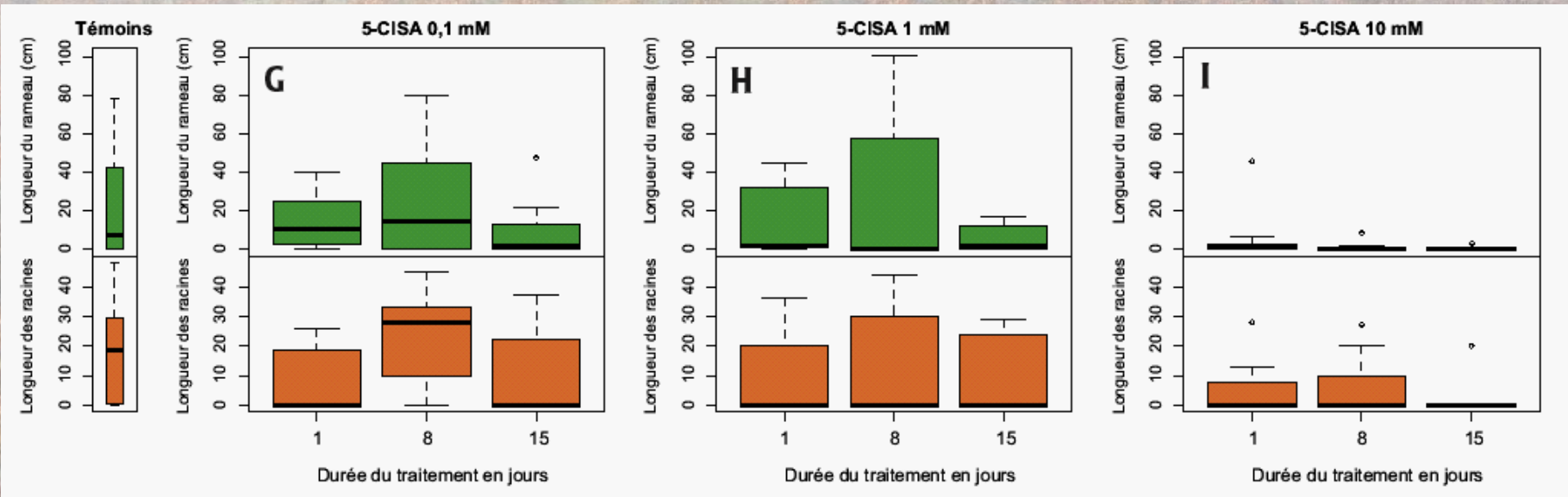
- En utilisant l'époxiconazole, seule la concentration de 1mM est moins phytotoxique





La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- Les plants se sont globalement mieux développés avec l'acide 5-chlorosalicylique seul. En effet, en présence de 5-CISA 0,1 mM, la croissance des tiges et des racines est comparable à celle des témoins. Un effet phytotoxique commence à apparaître à 1 mM et devient très marqué ensuite lorsque la concentration en 5-CISA atteint 10 mM





La recherche vous parle...
13 janvier 2012

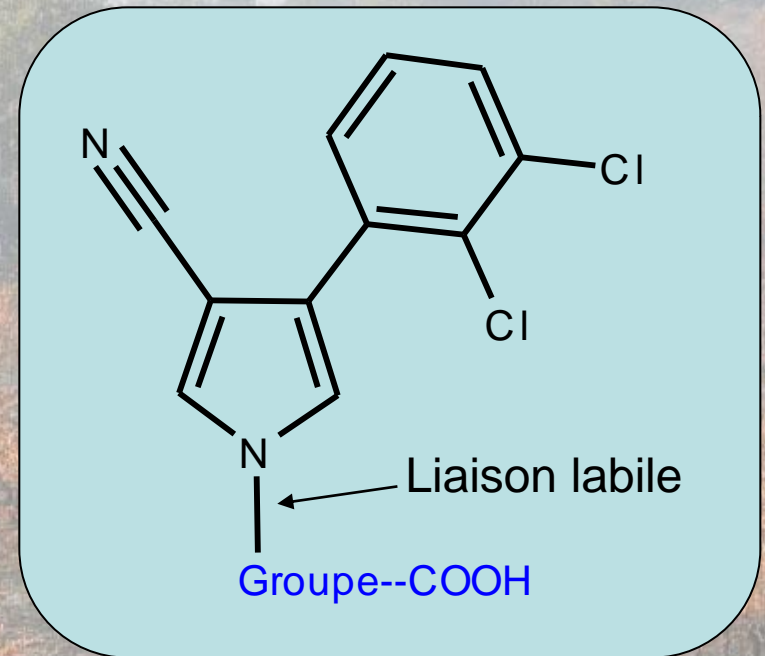
- **D'autres triazoles ont été testés : propiconazole, penconazole**
- **En conclusion à cette expérimentation, on observe qu'un traitement fongicide des bois de bouture, quelle que soit la substance choisie parmi les trois triazoles testés, exerce un effet plus délétère pour 15 jours d'exposition que pour 8 ou 1 jour. D'une manière générale, la dose 5 mM est clairement trop élevée**
- **D'autres familles de molécules moins phytotoxiques que le triazoles devront être testées**

Nouveaux phénylpyrroles synthétisés au cours de ce projet



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

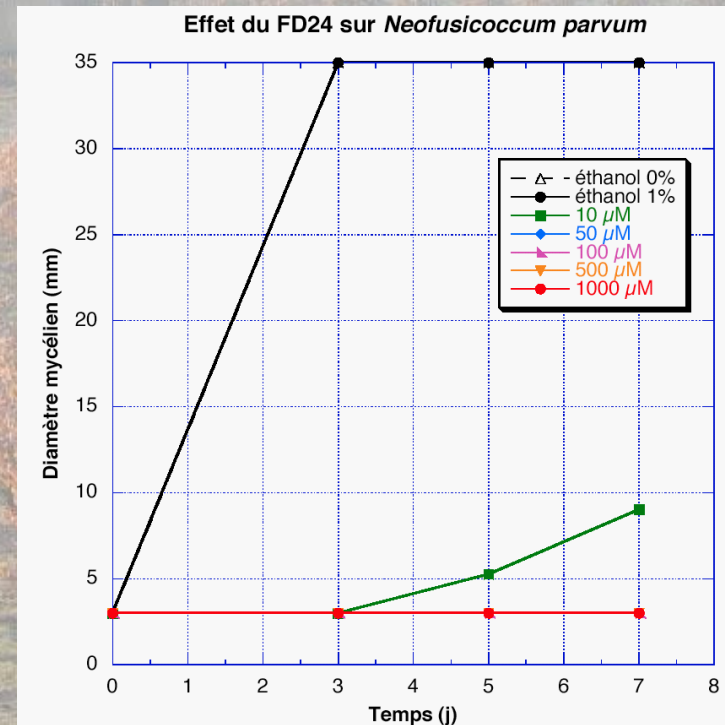
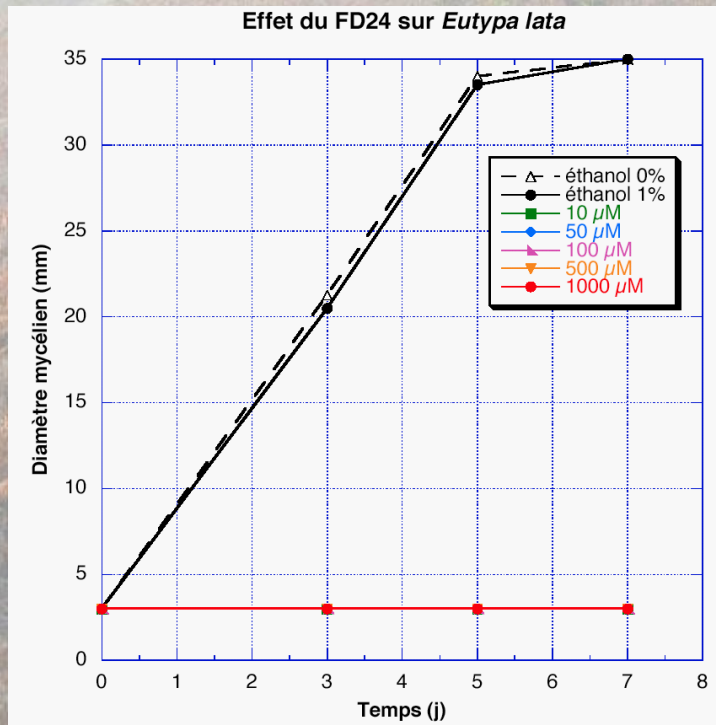
- La synthèse de nouveaux composés se poursuit, notamment avec l'objectif d'obtenir des prodrogues qui permettent la mobilité dans la plante avant d'être scindées pour libérer la matière active *in situ*





La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- Ces nouveaux composés vont être évalués dans un premier temps quant à leur activité biologique *in vitro* sur les différents champignons responsables des maladies du bois. Voici l'exemple de FD 24 :





- **Ces travaux sont financés sur une période de 3 ans par FranceAgriMer (CPER régions Pays de Loire et Centre) et InterLoire (Interprofession des Vins du Val de Loire)**





La recherche vous parle...
13 janvier 2012

- **La situation très particulière de notre vignoble doit nous amener collectivement à être vigilants sur au moins 2 points :**
 - **Tester systématiquement la validité de TOUTES les solutions commerciales qui sont proposées aux viticulteurs, souvent à des coûts élevés. Les résultats, positifs ou pas, doivent ensuite être divulgués largement pour que les viticulteurs fassent leur choix en connaissance de cause**
 - **Veiller à ce que les avancées obtenues lors de nouveaux programmes de recherche dans ce domaine soient accessibles immédiatement et sans restrictions à toute la filière viticole**



La recherche vous parle...
13 janvier 2012

Merci pour votre attention !

