

**AFPP – 10^e CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 3, 4 et 5 DÉCEMBRE 2012**

**"BioMolChem" : UNE METHODE POUR EVALUER L'ETAT DES DEFENSES DE LA
VIGNE: DU GENE AU CHAMP.**

M-C. DUFOUR⁽¹⁾, G. TARIS⁽¹⁾, L. DRUELLE⁽¹⁾, P. SAURIS⁽¹⁾, D. MERDINOGLU⁽²⁾, S.
CLUZET⁽³⁾, M-F CORIO-COSTET⁽¹⁾

⁽¹⁾ INRA, ISVV, UMR 1065 Santé et agroécologie du vignoble, BP 81, 33883 Villenave
d'Ornon, France, dufour@bordeaux.inra.fr

⁽²⁾ INRA, UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, BP 20507, 28 rue de Herrlisheim
68021 COLMAR CEDEX

⁽³⁾ Université de Bordeaux Segalen, ISVV, GESVAB-EA3675, 33883 Villenave d'Ornon,
France

RÉSUMÉ

Une méthode d'évaluation de l'état des défenses de la vigne a été développée au niveau biologique (inhibition de croissance), moléculaire (expression de gènes impliqués dans les défenses) et biochimique (analyses qualitatives et quantitatives des polyphénols), nommée "BioMolChem". La méthode "BioMolChem" permet d'établir des corrélations préliminaires entre l'expression des gènes de défense et la présence de certains stilbènes connus ou inconnus avec le niveau de protection des feuilles ou des grappes, selon les composantes de l'interaction plante-pathogène (variabilité inter- et intra-spécifique des agents pathogènes, variabilité génétique de la vigne et utilisation de différents produits éliciteurs). Ainsi est-il possible de disposer de ces indicateurs de défenses pour évaluer l'état de défense de la plante.

Mots-clés : *Vitis vinifera*, marqueurs de défense, expression de gènes, stilbènes, protection de la vigne, éliciteur.

SUMMARY

**"BIOMOLCHEM": A METHOD TO ASSESS THE GRAPEVINE DEFENSE STATUS,
NATURAL OR INDUCED : FROM GENE TO THE FIELD.**

A method for evaluating the grapevine defense status was developed with three approaches: biological (growth inhibition), molecular (expression of genes involved in the defense) and biochemical (qualitative and quantitative analyzes of polyphenols), called "BioMolChem ". By modifying the components of the plant-pathogen interaction (inter- and intra-specific pathogen diversities, grapevine genetic variability and the use of elicitors), the method "BioMolChem" allows to correlate gene expression, the presence of stilbenes with the leaf or cluster protection level. So, it is possible to assess the use of these indicators as markers of defense to estimate the state of plant defense.

Key words: *Vitis vinifera*, defense markers, gene expressions, stilbenes, grapevine protection, elicitor.

INTRODUCTION

La lutte contre les champignons phytopathogènes biotrophes nécessite l'utilisation de fongicides. Le vignoble français consomme plus de 16% des fongicides commercialisés chaque année en France. Pour réduire leur impact sur l'environnement, sur la résistance aux pesticides, et la santé, des efforts doivent être entrepris pour développer des stratégies innovantes de réduction des intrants pesticides qui soient alternatives ou complémentaires.

L'utilisation d'éliciteurs, induisant les défenses des plantes s'avère une méthode intéressante à explorer en termes d'efficacité et de comportement sur la plante. En effet, les plantes sensibles aux agents pathogènes possèdent la "machinerie" nécessaire pour assurer la résistance, mais celle-ci n'y est pas activée à un niveau suffisant pour limiter l'infection. La stimulation des défenses des plantes en condition de laboratoire permet de limiter le développement des bioagresseurs. En revanche, l'application de cette méthode *in natura* semble plus délicate, et conduit généralement à des efficacités variables, très dépendantes du status génétique de la plante, des conditions environnementales et de la pression parasitaire.

Il est important de comprendre les mécanismes mis en place dans la plante, et de posséder des marqueurs qui nous renseignent sur le statut de résistance de la vigne pour évaluer l'efficacité de ces stimulateurs et mieux connaître leur potentiel de protection dans le cadre de nouvelles stratégies de lutte.

Le développement d'une méthode d'évaluation des défenses de la vigne a été entrepris. Elle a été désignée "BioMolChem".

* **Bio** : Le test ultime de l'efficacité des défenses d'une plante est avant tout biologique et se caractérise par sa capacité à limiter, voire stopper le développement d'un parasite. Ainsi, en choisissant des souches de mildiou ou d'oïdium appartenant à différents groupes phénotypiques ou génotypiques, est-il possible d'évaluer l'efficacité d'un Stimulateur de Défense des plantes (SDP) en fonction de la variabilité des bioagresseurs.

* **Mol** : une plante soumise à une agression et/ou à une stimulation de ses défenses met en œuvre différents mécanismes, faisant appel à une cascade de signalisation moléculaire, qui conduiront *in fine* à différents niveaux de protection. Il est possible d'obtenir une vue partielle des défenses mises en place en suivant l'expression de gènes marqueurs impliqués dans ces processus de défenses. Ainsi, le niveau d'expression de 25 gènes de *Vitis vinifera* impliqués dans les défenses (codant pour des PR-protéines ou des enzymes impliquées dans des voies de signalisation hormonale ou de biosynthèse...) est mesuré par RT-PCR quantitative (RT-qPCR).

* **Chem** : la vigne est connue pour ses capacités à synthétiser de nombreux polyphénols dont des phytoalexines qui peuvent être impliquées dans la lutte contre les parasites. L'analyse qualitative et quantitative de polyphénols est réalisée par HPLC.

Cette méthode a permis d'évaluer l'efficacité de deux phosphonates et d'un analogue de l'acide salicylique, sur différents phénotypes de mildiou de la vigne (sensibles ou résistants aux fongicides - *Plasmopara viticola*) et différents génotypes d'oïdium (de groupe génétique A ou B – *Erysiphe necator*).

Cette approche "BioMolChem" a permis d'établir des corrélations entre l'expression de gènes de défense, la présence de certains stilbènes et une efficacité des défenses de *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon vis-à-vis de l'oïdium et du mildiou. Ainsi, les réactions de défense de la plante sont-elles modulées, en fonction de l'éliciteur considéré, mais aussi en fonction de la diversité phénotypique et génétique des agents pathogènes contre lesquels elle se défend. Ces défenses se caractérisent par une surexpression d'un ensemble de gènes de défense et une accumulation de composés phénoliques spécifiques.

Les marqueurs (gènes et molécules) étant identifiés, la méthode "BioMolChem" est actuellement testée *in natura* et les résultats préliminaires semblent conforter ceux obtenus au laboratoire. Dans des conditions de fortes pressions parasitaires, il serait donc possible de protéger les feuilles et les grappes à l'aide de SDP, et des essais d'association ou d'alternance avec des fongicides conventionnels montrent l'intérêt potentiel de l'emploi des SDP au vignoble.

Dans le cadre d'une viticulture innovante et durable, les SDP et la méthode "BioMolChem" ont été appliqués sur des génotypes hybrides (*Vitis vinifera* x *Muscadinia rotundifolia*). Nous révélons selon le niveau de résistance intrinsèque des génotypes (plus ou moins résistants à l'oïdium et au mildiou), qu'il est possible d'augmenter le niveau de la résistance exprimée par élicitation. Ainsi, les SDP pourraient-ils s'avérer des alliés d'intérêt pour l'utilisation de variétés partiellement résistantes et limiter potentiellement le contournement des QTL de résistance. L'ensemble de ce travail a conduit à l'obtention de résultats qui nous permettent de mieux comprendre comment la vigne réagit aux SDP dans son environnement agronomique. Leur exploitation devraient nous permettre de préciser l'utilisation des éliciteurs dans différentes conditions et de développer des stratégies adaptées. Ce travail intégrant la variabilité inter- et intra-spécifique de deux parasites biotrophes (*E. necator* et *P. viticola*) se positionne résolument dans une optique de compréhension et d'applications de la stimulation des défenses de la vigne : du gène au champ.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIEL VEGETAL

En condition contrôlée

Des boutures foliaires de *Vitis vinifera*, cv. Cabernet-Sauvignon et de 4 génotypes, provenant d'un programme d'amélioration variétale réalisé à l'INRA de Colmar et visant à cumuler des sources de résistance ont été utilisés (génotypes issus d'un croisement entre *Muscadinia rotundifolia* et *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon). Différents QTLs de résistance au mildiou et à l'oïdium ont été introgressés (Bellin *et al.*, 2009) :

- 7054 et 7056, sensibles
- 7001 et 7160 possédants le QTL1
- 7210 possédant le QTL2
- 7164 cumulant les 2 QTLs 1 et 2

Les plants, ont obtenus et fournis par l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin dirigée par Didier Merdinoglu (GAV-SVQV).

Au vignoble

Les expérimentations ont été réalisées au domaine expérimental de Couhins (45 ha) situé aux portes de Bordeaux, sur un terroir reconnu comme l'un des meilleurs de l'AOC Pessac-Léognan. Le sol est composé d'une couche d'argile qui repose sur une roche calcaire, très bien toléré par le cépage Cabernet Sauvignon greffé sur le porte-greffe Fercal qui présente également une grande tolérance au phylloxera radicole, au mildiou et à l'antracnose. La conduite en guyot double permet d'obtenir une bonne répartition foliaire et un étalement de la récolte. La parcelle expérimentale est constituée de 4 blocs de trois ceps répétés 4 fois par modalité.

MATÉRIEL FONGIQUE

Collection d'isolats et production d'inoculum

Plasmopara viticola

Une collection de souches mono-sporange issues de collectes sur le terrain, ont été repiquée sur des feuilles de vigne en survie et conservées à – 20°C. Six souches présentant des sensibilités différentes à plusieurs fongicides ont été utilisées (Corio-Costet *et al.*, 2010).

Erysiphe necator

Les souches d'oïdium prélevées sur des parcelles sont repiquées sur des feuilles maintenues en survie ou conservées sur des vitro-plants de vigne à 15 °C, après un isolement monoconidien. Dix souches appartenant au groupe génétique A et 9 au groupe B ont été utilisées au cours des expériences (Dufour *et al.*, 2009).

PRODUIT UTILISÉ

Acibenzolar S-méthyle ou BTH

Nom UIPAC: S-methyl (1, 2, 3) benzothiadiazole 7 – carbothioate.

Nom commercial: Bion®, C₈H₆N₂OS₂, PM = 210.

Le BTH est appliqué à 400 mg/L de matière active lors des essais au laboratoire sur des disques de feuilles et à 2 g/L sur les essais au vignoble.

MÉTHODES

Evaluation des efficacités de défense de la vigne au niveau biologique

In vitro

L'efficacité du traitement est déterminée par une évaluation visuelle du pourcentage de croissance des agents pathogènes sur les disques de feuilles après 12 jours de croissance pour l'oïdium et après 7 jours pour le mildiou à 22°C. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage moyen d'inhibition de la croissance du champignon par rapport à la modalité témoin, pulvérisée avec de l'eau stérile (Corio-Costet et al., 2010 ; Dufour *et al.*, 2009).

Au vignoble

Les tests sont réalisés sur une parcelle expérimentale, constituée de répétition de 4 blocs constitués de trois ceps de Cabernet Sauvignon non traités ou traités de manière hebdomadaire avec 2 g/L de matière active de BTH et 2,1 g/L de mancozèbe (fongicide de référence). Les traitements ont débuté le 5 mai 2009 au stade phénologique 13-14 de l'échelle BBCH (3-4 feuilles étalées) et ont cessé le 21 juillet au stade 79 de l'échelle BBCH (fruits et baies ont atteint leur taille finale), soit 12 traitements. Une inoculation artificielle a été réalisée le 27 mai, (stade 55, BBCH) 24 h après le quatrième traitement, à raison de 6 feuilles par cep pulvérisé avec une solution à 44 000 sporanges /ml. Quatre prélèvements sont effectués (24h après les traitements) au cours de la période de test, à raison de 12 feuilles par modalité pour tester au laboratoire l'efficacité des produits au niveau biologique, biochimique et moléculaire. L'évaluation de la maladie au vignoble a débuté le 4 juin, après 5 traitements et une semaine après l'inoculation artificielle. L'évaluation des maladies au vignoble consiste à évaluer la sévérité (% moyen d'attaque) et l'intensité (% de feuilles attaquées) des feuilles et des grappes au cours de la saison. (sévérité et intensité d'attaque) (Dufour *et al.*, 2009).

Evaluation des défenses de la vigne au niveau moléculaire

Extraction des ARNs, rétrotranscription et amplification par qPCR

L'extraction des ARNs est réalisée en accord avec le protocole décrit par Reid et coll. (2006), à partir de feuilles de vigne congelées dans l'azote liquide, conservées à - 80°C. Deux µg d'ARNs sont traités à la DNase puis rétro-transcrits en utilisant 1,2 µM d'oligo d(T)₁₅ et la reverse transcriptase M-MLV de Promega selon les recommandations du fabricant. Les ADNc obtenus sont ensuite stockés à - 20 °C (Dufour *et al.*, 2009).

Les réactions de qPCR sont réalisées en double, sur un iCycler (Biorad France, Ivry sur Seine) programmé pour 40 cycles (10 s à 95°C, 10 s à 55°C et 20 s à 72 °C) en utilisant le SYBR Green pour détecter la synthèse de DNA double-brin (issu de l'amplification PCR), dans un volume final de 15 µl contenant 7 µl d'Absolute Blue qPCR SYBR® Green Fluorescein mix (ABGene, France), 1 µl de chaque amorce (sens et anti-sens) à 1 µM et 5 µl de ADNc produits précédemment.

Pour chaque gène et pour chaque modalité, une valeur de Cq moyen (cycle quantification) est obtenue, représentant la valeur du nombre de cycle de qPCR à partir duquel le seuil de fluorescence devient significativement différent du bruit de fond. Ensuite un ΔCq est déterminé pour chaque gène, pour chaque modalité comme étant la différence de Cq du gène étudié et le Cq du gène de référence (EF1γ) : $\Delta Cq = Ct(\text{gène } x) - Ct(\text{EF1}\gamma)$.

L'expression relative (ER) des gènes est ensuite calculée en appliquant la formule suivante (Germer *et al.*, 2000): $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (modalité étudiée) - ΔCt (modalité témoin) (Dufour *et al.*, 2012).

Evaluation des défenses de la vigne au niveau biochimique

Préparation des échantillons

Les feuilles prélevées sont placées durant au moins une heure à -80°C puis lyophilisées pendant une nuit. Après lyophilisation, les feuilles sont extraites d'après le protocole décrit par Dufour *et al.*, 2012.

Dosages HPLC

Le dosage des stilbènes (isomère *trans* du resvératrol et du picéide) sont réalisés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une colonne phase-reverse Prontosil C18 (5 µm). La détection des stilbènes est réalisée à l'aide d'un détecteur à fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 300 nm et une longueur d'onde d'émission de 390 nm et à l'aide d'un détecteur UV multi-longueurs d'onde (barette d'iode DAD) à 220, 280 et 307 nm qui correspondent aux longueurs d'onde optimales pour les stilbènes.

Analyses des données

Pour évaluer l'efficacité de stimulation des défenses de la vigne et l'expression des gènes face à la diversité des pathogènes, toutes les données sont soumises soit à une analyse de covariance par modèle général linéaire (données d'efficacité) soit à une analyse de variance (données d'expression et biochimiques) en utilisant un programme d'analyse statistique Systat 11 (Systat Software, Inc). Les différences significatives dans les valeurs moyennes sont déterminées au seuil de 0,05 et les comparaisons deux à deux sont effectuées par le test de Tukey.

RÉSULTATS

Evaluation des défenses de la vigne au niveau biologique

L'efficacité des défenses de la vigne peut être évaluée au niveau biologique comme la capacité de la plante à limiter le développement d'un agent pathogène. Les résultats sont présentés comme le pourcentage moyen d'inhibition de la croissance du champignon par rapport à la modalité témoin, le cultivar Cabernet Sauvignon, génotype sensible au mildiou et à l'oïdium. (Tableau 1).

Après application d'un stimulateur des défenses de plante (éliciteur), on note une inhibition de croissance respectivement de 82 et 74 % du mildiou et de l'oïdium (Tableau 1). A l'aide de tests biologiques, il est également possible d'évaluer quantitativement les niveaux de résistance de génotypes hybrides issus de programmes d'amélioration (INRA Colmar) suite à l'introgression des QTL majeurs de résistance. Ainsi le génotype ayant acquis le QTL1 est significativement plus sensible à l'oïdium qu'au mildiou mais également moins résistant que le génotype 2. De plus, il est possible d'augmenter les défenses des génotypes hybrides par élicitation, les rendant résistants au mildiou et à l'oïdium.

Lors des expérimentations au vignoble, les sévérités d'attaque du mildiou et de l'oïdium ont été évaluées fin juillet (Dufour *et al.*, 2009). Ainsi, le cépage Cabernet-Sauvignon, est fortement attaqué, et la sévérité atteint respectivement, 62 et 65 % sur feuilles, pour le mildiou et l'oïdium. Les résultats obtenus au cours des trois années d'expérimentation au vignoble montrent qu'il est possible de réduire significativement les épidémies de mildiou et d'oïdium par application d'un éliciteur. Nous avons ainsi obtenu une réduction significative des attaques de mildiou (33% de sévérité en moins) et d'oïdium (80 % de moins) après élicitation.

Tableau 1 : Pourcentages moyens d'inhibition de croissance de *Plasmopara viticola* et d'*Erysiphe necator* obtenus sur différents génotypes de vigne, élicités ou non et sévérités moyennes obtenues sur feuilles au vignoble entre 2009 et 2011 sur des blocs de trois cepes élicités ou non. (Mean percentages of growth inhibition of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* obtained on different grapevine genotypes, elicited or not and severity averages on leaves in the vineyards between 2009 and 2011 on blocks of three vines stocks elicited or not).

		Inhibition croissance pathogènes (%)	
		Mildiou	Oïdium
CS <i>in vitro</i>	Témoin	0 ± 0	0 ± 0
	+ Eliciteur	82,11 ± 4,21	74,09 ± 7,34
Génotype QTL1	Témoin	85,00 ± 3,6	66,18 ± 6,87
	+ Eliciteur	100 ± 0	100 ± 0
Génotype QTL2	Témoin	100 ± 0	97,11 ± 0,41
	+ Eliciteur	100 ± 0	100 ± 0

		Sévérité (% moyen d'attaque) sur feuilles	
		Mildiou	Oïdium
CS <i>in natura</i>	Témoin	61,87 ± 14,80	65,00 ± 17,0
	+ Eliciteur	41,70 ± 16,63	13,50 ± 12,50

Evaluation des défenses de la vigne au niveau moléculaire

Pour confirmer que l'efficacité observée au niveau biologique est la conséquence d'une stimulation des défenses de la vigne, nous avons mesuré le niveau d'expression de gènes impliqués dans les défenses de la vigne. Les gènes étudiés codent pour des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des phytoalexines et phytohormones, dans la préservation du statut redox, et des gènes codant pour des protéines PR (« pathogenesis related »).

Les niveaux d'expression sont calculés, relatifs aux niveaux d'expression des feuilles sensibles témoins non traitées et non inoculées (N°1 à 5, Tableau 2) ou par rapport au génotype correspondant non traité et non inoculé (N°6 et 7, Tableau 2).

L'élicitation du cv. sensible Cabernet-Sauvignon induit une modulation de l'expression des gènes de défenses, avec 81,25 % des gènes voient leur niveau d'expression augmenté, confirmant une induction significative des défenses de la vigne après une stimulation. Cet effet stimulateur est moins marqué lorsqu'il est appliqué au vignoble puisque seulement 31,25 % des gènes présentent des niveaux de sur-expression.

Les génotypes hybrides possédant le QTL2 présentent des niveaux plus importants d'accumulation de transcrits codant les PR protéines, ou pour ceux impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et dans le renforcement de la paroi, comparé aux génotypes possédant le QTL1. De plus, nos résultats montrent également que dans les génotypes possédant les deux QTLs, le nombre de gènes présentant une sur-expression est supérieur à celui observé dans les génotypes possédant un seul des deux QTL.

Les génotypes hybrides élicités présentent des niveaux d'expression des gènes de défense supérieurs à ceux de leur contrôle respectif non traité. Ces résultats démontrent qu'il est possible d'augmenter le niveau des défenses de la vigne partiellement ou totalement résistante par application d'un stimulateur des défenses.

Tableau 2 : Niveaux d'expression des gènes impliqués dans les défenses de *Vitis vinifera* (cv Cabernet Sauvignon, CS) élicité au laboratoire ou *in natura*, ou de génotypes hybrides présentant des niveaux de résistance au mildiou et à l'oïdium différents, élicités ou non évalués de façon relative par rapport au cultivar sensible non traité.

(Expression levels of genes involved in defenses of *Vitis vinifera* (cv Cabernet Sauvignon, CS) elicited in the laboratory or *in natura*, or hybrids genotypes with levels of resistance to downy and powdery mildew different, elicited or not, assessed way relative to untreated susceptible cultivar.)

N°	Modalités	PR1	PR2	PR3	PR6	PR8	PR10	PAL	STS	CHI	LDOX	LOX	GST	ACC	ANTS	CHORM	CHORS
1	CS + Eliciteur <i>in vitro</i>	29.15	3.45	7.92	3.32	5.47	7.26	4.75	5.14	-5.64	2.21	2.51	4.80	4.27	3.82	7.72	3.27
2	CS + Eliciteur <i>in natura</i>	3.76	12.32	2.02	1.26	4.40	5.40	3.67	2.34	1.92	1.27	-1.09	2.66	-1.73	-2.28	-5.28	-1.82
3	Génotype (QTL1) <i>in vitro</i>	-1.16	nd	nd	3.89	-3.48	1.25	6.07	-2.55	1.64	4.08	nd	32.46	-1.07	25.61	1.24	2.70
4	Génotype (QTL2) <i>in vitro</i>	19.60	nd	-3.18	12.90	-1.26	22.14	8.05	7.17	2.04	1.72	2.98	2.43	1.10	2.26	-1.88	2.72
5	Génotype (QTL1+QTL2) <i>in vitro</i>	37.64	1.96	-6.59	28.35	1.28	1.30	14.43	7.34	3.69	7.64	7.88	1.70	1.66	6.88	1.05	6.25
6	Génotype (QTL1) + Eliciteur <i>in vitro</i>	28.24	15.14	8.40	3.50	35.86	2.54	5.05	5.45	3.23	44.46	15.29	10.49	4.23	5.09	1.69	6.31
7	Génotype (QTL2) + Eliciteur <i>in vitro</i>	6.38	1.38	1.12	3.70	13.54	2.42	2.00	1.58	17.95	nd	nd	nd	12.63	13.33	1.01	28.31

Evaluation des défenses de la vigne au niveau biochimique

En absence d'infection, les quantités de resvératrol présentes dans les feuilles de tous les génotypes étudiés (sensibles et résistants) sont identiques, qu'ils soient stimulés ou non (Tableau 3). A l'inverse, la teneur en resvératrol dans les feuilles infectées par *P. viticola* ou *E. necator* est significativement supérieure (Tableau 3).

De façon similaire, seules les teneurs en picéide dans les feuilles infectées par l'oïdium sont significativement supérieures. Bien que le resvératrol et le picéide soient décrits comme des marqueurs biochimiques des défenses de la vigne, ils ne semblent pas être des marqueurs de protection car leurs teneurs sont élevées dans les feuilles où les agents pathogènes se développent.

Quand au ptérostilbène, une forme méthylée du resvératrol, une accumulation significative dans les feuilles sensibles élicitées (*in vitro* et *in natura*) ainsi que dans les feuilles des génotypes hybrides est observée. De plus, il semble que la teneur en ptérostilbène dans les génotype hybrides soit d'autant plus importante que le niveau de résistance est élevé. Ainsi les quantités détectées dans les feuilles du cultivar sensible élicité sont plus faible que celles quantifiées dans le génotype partiellement résistant. Ce dernier contenant lui-même moins de ptérostilbène que le génotype totalement résistant.

Tableau 3 : Quantités de resvératrol, de picéide et de ptérostilbène détectées dans les feuilles de vigne (en mg/g de matière sèche \pm SEM). (Amounts of resveratrol, piceid and pterostilbene detected in grape leaves (in mg / g dry weight \pm SEM)).

		Resvératrol (mg/g MS)	Picéide (mg/g MS)	Ptérostilbène (mg/g MS)
CS Témoin	<i>in vitro</i>	11,75 \pm 6,86	18,97 \pm 8,43	26,20 \pm 2,34
CS élicité	<i>in vitro</i>	26,49 \pm 10,11	20,57 \pm 8,642	50,20 \pm 1,61
CS infecté Mildiou	<i>in vitro</i>	135,65 \pm 34,13	28,58 \pm 3,30	21,70 \pm 1,16
CS infecté Oïdium	<i>in vitro</i>	137,46 \pm 38,10	59,74 \pm 10,14	20,00 \pm 0,04
CS témoin	<i>in natura</i>	12,64 \pm 3,677	30,10 \pm 3,84	20,56 \pm 3,13
CS élicité	<i>in natura</i>	13,56 \pm 7,89	34,96 \pm 7,14	39,47 \pm 6,17
Génotype QTL1 témoin	<i>in vitro</i>	0,52 \pm 0,11	9,38 \pm 3,98	62,69 \pm 19,38
Génotype QTL1 élicité	<i>in vitro</i>	2,27 \pm 0,95	14,56 \pm 1,51	69,15 \pm 9,76
Génotype QTL2 témoin	<i>in vitro</i>	4,19 \pm 2,54	29,52 \pm 7,03	113,37 \pm 24,45
Génotype QTL2 élicité	<i>in vitro</i>	0,87 \pm 0,14	15,66 \pm 0,84	96,98 \pm 25,16

DISCUSSION

Les modifications observées aux niveaux moléculaire et biochimique montrent que les mécanismes de défense de la vigne sont complexes. Cette étude a permis d'étudier le comportement de la vigne après une élicitation et face à des attaques de mildiou et d'oïdium. Les résultats montrent que la plante module son métabolisme en fonction du produit utilisé mais également en fonction de la diversité des agents pathogènes contre lesquels elle se défend.

L'approche tripartite a permis de mettre en relation l'efficacité observée vis-à-vis des différents agents pathogènes avec des profils d'expression de gènes ou la présence de molécules. Ainsi, en accord avec Little *et al.* (2003), les quantités de stilbènes détectées sont-elles d'autant plus importantes que le genotype est résistant (données non présentées), et , des dérivés du resvératrol, e.g. le ptérostilbène, interviendraient et participeraient activement à une lutte efficace contre les agents pathogènes étudiés. En effet, les quantités de ce composé sont corrélées au niveau de résistance observée chez la variété sensible (CS) élicités ou chez les géotypes hybrides présentant des niveaux de résistance variables.

La transposition de la méthode « BioMolChem » du laboratoire à des essais *in natura* a permis d'étudier les réponses de la feuille de vigne et de définir l'état de défense de la vigne face au mildiou et à l'oïdium dans différentes conditions (élicitation ou non, infection oïdium ou mildiou). Les cinétiques d'expression de gènes par RT-qPCR et l'analyse des polyphénols impliqués dans les défenses de la vigne ont permis de corréler l'expression de certains gènes à une protection contre le mildiou *in natura*. De plus, certaines accumulations de produits comme le ptérostilbène sont apparues corrélées avec un niveau de protection induite par le traitement éliciteur.

CONCLUSIONS

Les résultats obtenus ont permis de valider l'outil "BioMolChem" et montrent qu'il existe des corrélations entre le niveau d'expression de gènes de type Pathogenesis Related protéines (PR protéines), les niveaux d'expression de gènes codant pour des enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse du tryptophane, certains impliqués dans la biosynthèse des stilbènes et flavonoides et l'efficacité de protection. De manière similaire, il existe des corrélations entre la présence de certaines molécules connues et inconnues, et l'efficacité de protection. À noter que lors de ces expériences, si le resvératrol, une phytoalexine bien connue de la vigne, s'avère un bon marqueur de stimulation des défenses, elle n'est pas un bon marqueur de protection. Ainsi aujourd'hui dispose-t-on d'un outil qui permet de mieux comprendre quel est l'état de défense et de protection de la vigne, tant au niveau du laboratoire, qu'au niveau du champ.

À ce jour, il est possible d'évaluer l'efficacité de molécules étudiées au vignoble et d'examiner le statut de défense de vigne *in natura*. Ainsi, la mise en place de stratégies de lutte alternative intégrant l'utilisation d'éliciteur et de variétés partiellement résistantes pourrait-elle être facilitée afin d'atteindre l'objectif du plan « Ecophyto 2018 » de réduction des intrants pesticides.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient S. Gambier pour la production de plants de vigne et les sociétés Syngenta, Proval et Bayer pour les dons de produits, l'Institut de Biologie Intégrative des Plantes pour les analyses biochimiques et moléculaires. Un grand merci au CIVB pour son soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon AF, Cipriani G, Morgante M, Testolin R, Di Gaspero G (2009) Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics* 120: 163-176

Corio-Costet MF, Dufour MC, Cigna J, Abadie P, and Chen WJ (2011) Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Eur. J. Plant Pathol*, 129: 315-329.

Dufour M-C., Druelle L., Sauris P., Taris G., Corio-Costet M-F. (2009) Efficacités de stimulateurs de défenses des plantes (BTH et phosphonates) sur l'oïdium et le mildiou de la vigne : impact de la diversité des pathogènes. AFPP, 9ème Conférence Internationale sur les maladies des plantes (Tours, 4-5 décembre), p 526-535. CD-Rom.

Dufour M-C., Fontaine S., Montarry J., Corio-Costet, M-F. (2011). Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. *Pest Management Science*, 67: 60-69

Dufour M-C., Lambert C., Bouscalt J., Merillon J. M., Corio-Costet M-F. 2012. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*). *Plant Pathology*, sous presse.

Little C-R., Magill C-W. 2003. Elicitation of defense response genes in sorghum floral tissues infected by *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata* at anthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 271-279

Reid K. E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund. S.T., 2006 - An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development - art. no. 27. *BMC Plant Biology* 6, 27-27.