



# Pythium oligandrum testé contre l'esca de la vigne

L'oomycète *Pythium oligandrum* a été testé au laboratoire, sur jeunes plants de vigne, contre un champignon pionnier de l'esca. Il s'est montré prometteur.

AMIRA YACOUB\* \*\* \*\*\*, JONATHAN GERBORE\*\*\*\*, NOËL MAGNIN\* \*\*, MARIE-CÉCILE DUFOUR\* \*\*, MARIE-FRANCE CORIO-COSTET\* \*\*, RÉMY GUYONEAUD\*\*\* ET PATRICE REY\*\* \*, D'APRÈS LEUR COMMUNICATION À LA 5<sup>E</sup> CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE L'AFPP, À LILLE, DU 11 AU 13 MARS 2015

**Tableau 1 : Liste des gènes utilisés pour étudier les réactions de défense de la vigne**

Gène	Abbrév.
<b>PR protéines</b>	
PR protéines de classe 1	PR1
PR protéines de classe 10	PR10
Chitinase de classe 3	CHIT3
Chitinase de classe 4	CHIT4
Protéines inhibant les polygalacturonases	PGIP
B-1,3 glucanase	GLU
Inhibiteur de sérine protéase	PIN
<b>Phénylpropanoïdes</b>	
Phénylalanine ammonia lyase	PAL
Stilbène synthase	STS
Chalcone isomérase	CHI
Chalcone synthase	CHS
Leucoanthocyanidine dioxégénase	LDOX
Anthocyanidine réductase	BAN
<b>Indoles</b>	
Antranilate synthase	ANTS
Chorismate mutase	CHORM
Chorismate synthase	CHORS
<b>Paroi</b>	
Callose synthase	CALS
Peroxydase	PER
Coniferyl alcohol glucosyl transferase	CAGT
<b>Références</b>	
Chaîne gamma du facteur d'élongation	EF1 $\gamma$
Glycéraldéhydes-3-phosphate déshydrogénase	GADPH
<b>Autres</b>	
9-Lpoxygénase	9-LOX
Glutathione S-transférase	GST
Acide 1-aminocyclopropane, 1-carboxylique oxydase	ACC

**L**es maladies du bois de la vigne, notamment l'esca, sont devenues très préoccupantes (Mugnai *et al.*, 1999 ; Rumbos et Rumbou, 2001 ; Gimenez-Jaime *et al.*, 2006 ; Bertsch *et al.*, 2013). Plus aucun traitement chimique n'est autorisé contre l'esca, ce qui pousse à recourir aux méthodes alternatives. L'une d'elles est la lutte biologique à l'aide de micro-organismes. Dans ce contexte, nous avons étudié l'action de *Pythium oligandrum*.

## Prémises de cette étude Souches de *Pythium oligandrum* collectées et caractérisées

Le choix s'est porté sur *P. oligandrum* car cet oomycète est naturellement présent dans la rhizosphère des ceps de vigne de la région bordelaise (Gerboire *et al.*, 2014).

De plus, la littérature le décrit comme un agent de lutte biologique. Il peut exercer un effet direct sur les pathogènes, ou indirect en stimulant les systèmes de défense de la plante. Cette induction peut être obtenue en appliquant des protéines élicitrices produites par *P. oligandrum* (l'oligandrine, POD1 et POD2) sur le végétal (Mohamed *et al.*, 2006 ; Takenaka *et al.*, 2006 ; Takenaka et Tamagake, 2009).

Nous avons isolé et purifié des souches de *P. oligandrum* à partir de racines de vigne

prélevées dans le vignoble bordelais. Nous les avons caractérisées au niveau génétique (Gerboire *et al.*, 2014). Toutes nos souches isolées de *P. oligandrum* produisent de l'oligandrine mais en quantités variables.

## Choix de l'espèce pathogène

Nous avons ensuite analysé les réponses de la plante face à l'infection par *Phaeoaniella chlamydospora* (Pch) suite à la colonisation des racines par *P. oligandrum*. Le choix a porté sur Pch car c'est un des pionniers de l'esca. Son inoculation dans le bois permet de reproduire des lésions nécrotiques. Les réponses de la vigne ont été étudiées au niveau moléculaire par analyse RT-qPCR de l'expression de vingt-deux gènes impliqués dans les mécanismes de défense de cette plante (Dufour *et al.*, 2013).

## Travail réalisé sous serre

### Dispositif expérimental

Des boutures de cabernet sauvignon (greffons certifiés par la chambre d'agriculture de Gironde) âgées de 8 semaines ont été utilisées sous serre en conditions contrôlées. L'essai a été randomisé (trois répétitions, trente boutures/modalité). Les modalités correspondent à des plants :

- témoins non percés ;
- témoins percés au niveau de la tige ;
- infectés par le champignon pathogène Pch au niveau de la tige (après perçage) ;

## RÉSUMÉ

♦ **CONTEXTE** - La principale pathologie affectant le bois des ceps étant l'esca, la recherche de moyens de type biocontrôle est active.

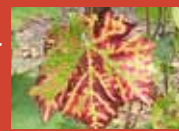
♦ **TRAVAIL** - Un essai de protection biologique contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca, *Phaeoaniella chlamydospora*, a été réalisé en utilisant l'agent de lutte biologique, *Pythium oligandrum*. Une série de vingt-deux gènes impliqués dans les méca-

nismes de défenses de la vigne ont été utilisés afin de déterminer les réponses de la plante lors de l'interaction *P. oligandrum*/*Vitis vinifera*/*P. chlamydospora*.

♦ **RÉSULTATS** - Une réduction de 50% des nécroses au niveau de la tige dues à *P. chlamydospora* a été obtenue après application de l'oomycète sur les racines des ceps. En présence de *P. oligandrum*, les plantes infectées par

*P. chlamydospora* montrent une surexpression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse des phytoalexines, c'est-à-dire la voie des phénylpropanoïdes et celle des indoles. Un effet potentialisateur des systèmes de défense induits par *P. oligandrum* a été observé.

♦ **MOTS-CLÉS** - Biocontrôle, vigne, esca, induction de résistance, *Pythium oligandrum*, *Phaeoaniella chlamydospora*, RT-qPCR.



- avec racines traitées par *P. oligandrum* sans infection par Pch ;
- infectés par Pch au niveau de la tige après traitement des racines par *P. oligandrum*.

#### Traitement par *P. oligandrum*

Les boutures ont été traitées avec une suspension d'oospores et de mycélium de *P. oligandrum* préparée par Biovitis SA (Saint-Étienne-de-Chomeil) à partir des souches CBS 118746 et cou59. Elle a été versée sur le sol au niveau des racines, d'abord au stade 7-8 feuilles puis trois jours plus tard.

#### Inoculation par le pathogène Pch

L'infection par Pch a été réalisée une semaine après la première inoculation par *P. oligandrum*. Un disque de mycélium de la souche SO37 de Pch était inséré dans la bouture préalablement percée à 4 mm de profondeur sous le premier bourgeon. Puis le trou était refermé avec de la paraffine.

#### Prélèvement des échantillons

Les prélèvements de tige ont été réalisés à trois dates différentes : T0 (deux heures après inoculation avec Pch), T+7 et T+14 jours, sur neuf boutures par modalité (trois plants/répétition) à chaque date.

#### Analyses moléculaire et statistique

Le niveau d'expression de vingt-deux gènes liés aux défenses de la vigne (Dufour *et al.*, 2013) a été quantifié par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Ces gènes codent pour des PR-protéines, des protéines de la synthèse de la paroi (Dufour, 2012) ou de la voie des phénylpropanoïdes, ou sont liés à la synthèse des oxylipines ou de l'éthylène (Tableau 1). Pour l'analyse statistique, le test de Kurskall-Wallis a été utilisé.

#### Résultats

##### État des plants de vigne

La taille des nécroses générées par Pch dans la tige des boutures a été mesurée. Chez les plants témoins (non percés et percés), aucune nécrose n'a été détectée.

Le niveau de nécroses dans les plants colonisés par *P. oligandrum* puis inoculés par Pch est environ la moitié de celui dans les plants seulement inoculés avec Pch.

##### Expression des gènes de défense de la vigne suite au « perçage » de tige

Pour évaluer l'effet du perçage des tiges, le niveau d'expression relative des gènes étudiés a été calculé par rapport aux plants témoins non percés.

Le perçage cause un stress mécanique : surexpression à T0 de douze gènes de défense de la plante représentant les cinq familles étudiées. Cela s'atténue rapidement.

##### Expression des gènes après inoculation de la tige par *P. chlamydozoïde*

Les réponses de la vigne suite à l'inoculation par l'agent pathogène Pch sont comparées à celle des « témoins percés », afin de soustraire « l'effet perçage » des résultats.

À T0 et T7, les plants répondent faiblement à l'infection. À T14, les gènes codant pour les PR-protéines montrent une surexpression significative. Parmi les gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, peu ou pas exprimés à T0 et réprimés à T7, trois sont surexprimés à T14.

Le gène LOX est réprimé à T7 et surexprimé à T14. De même l'enzyme de détoxification (GST) est très activée à T14. La voie de l'éthylène (ACC) reste inactive.

##### Expression après traitement des racines par *P. oligandrum*

Suite à l'introduction de *P. oligandrum* au niveau du système racinaire de la plante, le niveau d'expression relative a été calculé par rapport au témoin non percé.

# ECOBIOS®

“ biostimulant ”

Engrais biologique  
pour pulvérisation  
foliaire

Améliorez naturellement  
la qualité de vos vins



La **Lipoxylène®**, composant actif d'**Ecobios®**, stimule la photosynthèse et permet :

- un épaississement de la pellicule des baies de raisin, une alternative naturelle pour limiter le développement du botrytis (65 % d'efficacité en 2008 et 85% en 2009).
- un enrichissement en sucre, N assimilable et polyphénols aromatiques.
- une augmentation du poids moyen des grappes.
- un effet régénérateur en application après grêle.

#### Découvrez également

La solution Fortisève en perfusion pour maintenir les vignes en bonne santé face à l'ESCA !



**Tableau 2 : Après traitement des racines par *P. oligandrum*, les gènes des plants de vigne restent « calmes » en l'absence de pathogène**

Niveau d'expression relatif des gènes chez les plants de vigne traités avec *P. oligandrum* par rapport aux plants témoins non percés. Chiffre donné = différence significative.

Dates de prélèvements		T0	T7	T14
PR protéines (N. B. : PR = pathogenesis related)	PR1			
	PR10			
	CHIT3		-3,45	
	CHIT4	-5,76		
	PGIP	-2,29		
	GLU	-19,46		-2,82
	PIN	-6,19		-2,58
Phénylpropanoïdes	PAL			-1,88
	STS	-2,74		-2,21
	CHI	-2,22		
	CHS	-2,41		-1,78
	LDOX	-2,82	-1,40	2,08
	BAN	-2,03		
Indoles	ANTS		1,63	
	CHORM		-1,37	-1,65
	CHORS		1,35	
Paroi	CALS	-1,15	-1,45	-1,89
	PER	-1,57	1,58	
	CAGT	-2,96	1,35	-3,28
Synth. oxygénées	LOX		-1,27	
Détoxication	GST	-3,50		-2,22
Synth. éthylène	ACC	1,73		

De façon générale, l'expression des vingt-deux gènes étudiés est faible (Tableau 2).

#### Après inoculation des racines par *P. oligandrum* puis des tiges par Pch

Les expressions relatives des gènes des plants de la modalité *P. oligandrum* + Pch ont été calculées par rapport aux plants infectés par Pch seul (Tableau 3).

À T0, deux gènes sont légèrement surexprimés et dix-sept faiblement réprimés.

Presque tous les gènes sont fortement surexprimés à T7. La surexpression est moins marquée chez les gènes codant pour les protéines PR, qui sont les moins stimulés à deux exceptions près.

La stimulation continue à T14 pour les gènes liés au renforcement de la paroi, à la voie des indoles et celle de l'éthylène (ACC).

#### Ce qu'il faut retenir Effet bénéfique du pythium

L'essai en serre a montré que des boutures de cabernet sauvignon infectées au niveau de la tige par Pch après colonisation au niveau du système racinaire par *P. oligandrum* avaient développé des nécroses réduites d'environ 50% par rapport aux plants non colonisés.

**Tableau 3 : Après traitement des racines par *P. oligandrum*, les gènes des plants de vigne réagissent fortement à l'inoculation du pathogène au niveau de la tige**

Niveau d'expression relatif des gènes chez les plants traités avec *P. oligandrum* puis inoculés par Pch, par rapport aux plants inoculés par Pch sans traitement préalable avec *P. oligandrum*.

Dates de prélèvements		T0	T7	T14
PR protéines	PR1	-2,07	5,23	
	PR10	-3,54		-1,98
	CHIT3	-1,86		
	CHIT4			1,13
	PGIP			
	GLU		3,68	
	PIN	-5,05		-1,73
Phénylpropanoïdes	PAL		6,51	
	STS	-1,99	4,40	-1,45
	CHI	-2,23		
	CHS		15,74	1,81
	LDOX	2,07	7,04	
	BAN		3,99	-2,84
Indoles	ANTS	-2,39	3,23	1,37
	CHORM		5,33	1,75
	CHORS	-4,48	8,37	2,36
Paroi	CALS		1,84	4,98
	PER		11,90	2,50
	CAGT	-2,89		1,47
Synth. oxygénées	LOX	2,38	8,46	
Détoxication	GST	-1,96	3,22	
Synth. éthylène	ACC	-2,73	2,84	2,41

#### La vigne répond au pathogène Pch

Par ailleurs, les niveaux d'expression de vingt-deux gènes des systèmes de défense de la vigne sont différents selon que la plante est colonisée par l'agent antagoniste *P. oligandrum*, le champignon pathogène Pch ou les deux micro-organismes.

La réponse de la vigne à l'attaque par Pch passe d'abord par une répression des gènes codant pour les PR-protéines sept jours après infection, puis par leur stimulation une semaine plus tard. Les autres gènes étudiés sont réprimés (sauf les stilbènes).

Ces résultats diffèrent pour partie de ceux de Rotter *et al.* (2009). Ils ont constaté, suite à l'infection de la vigne par *Eutypa lata*, agent de l'eutypiose, la surexpression de plusieurs protéines et de la voie des phénylpropanoïdes. La réponse de la vigne semble dépendre du pathogène, la plante adaptant son système de défense.

#### La vigne réagit au stress mécanique

La méthode d'inoculation de Pch (perçage de tige) induit un stress abiotique chez la plante. C'est ce qu'indique la surexpression, deux heures après perçage, de nombreux gènes surtout ceux codant pour les PR-protéines.

Elle s'atténue rapidement et a disparu quatorze jours après le perçage.

Ceci suggère que les PR-protéines seraient induites de façon peu spécifique face à des stress abiotiques (perçage) ou biotiques (infection par Pch, *E. lata*, etc.).

#### *Pythium oligandrum* avec ou sans Pch

La réponse de la vigne face à *P. oligandrum* seul est très différente de celle face à Pch seul et face aux deux organismes.

Quasiment aucune induction de gènes n'est notée si *P. oligandrum* est seul présent. Mais les plants prétraités par *P. oligandrum* répondent plus vite et fort à l'attaque de Pch que les plants non prétraités. Ils montrent une forte induction des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phytoalexines, des enzymes de détoxication ainsi que des protéines de la paroi, sept jours après infection par Pch. Pour les PR-protéines, trois gènes sont surexprimés.

Ces résultats sont en accord avec Mohamed *et al.* (2006) montrant qu'après traitement des racines par *P. oligandrum*, les gènes codant pour les  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) et stilbène synthase (STS) sont surexprimés lors d'une attaque par *Botrytis cinerea*. Takenaka





*et al.* (2011) ont montré qu'un traitement racinaire de plants de tomate par les protéines de la paroi cellulaire (CWP) de *P. oligandrum* entraîne une surexpression des gènes codant pour la PAL et certaines PR protéines.

#### Effet sur les parois, effet croissance ?

Dans notre étude, au bout de quatorze jours, les plants colonisés par *P. oligandrum* et infectés par Pch voient s'exprimer fortement les gènes impliqués dans le renforcement de la paroi végétale et du tryptophane. La surexpression de gènes codant pour des molécules renforçant la paroi (callose et lignine) permettrait de limiter la pénétration du pathogène. La voie du tryptophane étant impliquée dans la synthèse de l'auxine, cela stimulerait la croissance de la plante.

Selon Takahashi *et al.* (2006) et Kawamura *et al.* (2009), l'application de *P. oligandrum* ou de ses protéines élicitrices active la voie de signalisation de l'acide jasmonique et celle de l'éthylène mais pas la voie de l'acide salicylique. Dans notre étude, la voie de l'éthylène est effectivement activée. Mais aucun gène étudié ici n'est impliqué dans les voies de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique : un dosage de ces acides dans les tissus des plants serait utile.

#### Hypothèse « potentialisation »

La réponse de la vigne inoculée par *P. oligandrum* et celle de la vigne inoculée par *P. oligandrum* puis infectée par Pch montrent que les mécanismes de défense de la vigne ne sont induits par *P. oligandrum* qu'en cas d'infection par Pch. Cela suggère l'existence d'un effet potentialisateur ou « priming ».

La potentialisation est un état physiologique qui permet à la plante d'induire plus vite et plus intensément ses mécanismes de défense face à un stress (Conrath, 2009). Theocharis *et al.* (2010) ont montré, chez la vigne, qu'un traitement avec la souche PsJN de *Burkholderia phytofirmans* stimule les défenses des plants de vigne face à un stress (abiotique dans leur cas : le froid).

#### Potentialités à explorer

Notre étude a montré que *P. oligandrum* présente des potentialités intéressantes pour lutter contre un champignon impliqué dans l'esca. Ainsi *P. oligandrum* stimule les réactions de défense des plants de vigne et induit un niveau de protection de 50% par rapport aux plants témoins infectés.

Ceci suggère d'explorer l'effet des molécules élicitrices de *P. oligandrum*, par exemple en traitant des jeunes ceps avec du filtrat

de culture ou les molécules pures. L'étude d'autres gènes impliqués dans les voies de défense de la plante (acide salicylique, acide jasmonique, autres métabolites) informerait sur l'effet de *P. oligandrum* dans l'interaction avec la plante et le Pch.

#### POUR EN SAVOIR PLUS

**AUTEURS :** \*\*\*A. YACOUB, \*\*\*J. GERBORE, \*\*\*N. MAGNIN, \*\*\*M.-C. DUFOUR, \*\*\*M.-F. CORIO-COSTET, \*\*\*R. GUYONEAUDET \*\*P. REY

\*Inra, ISVV, UMR1065 Santé et agroécologie du vignoble (Save) 33140 Villenave-d'Ornon.  
\*\*Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 Save, Bordeaux Sciences Agro 33140 Villenave-d'Ornon.  
\*\*\*UMR CNRS 5254/Iprem-EEM, Ibeas, université de Pau et des Pays de l'Adour 64013 Pau.  
\*\*\*\*Biovitis 15400 Saint-Étienne-de-Chomeil.

**CONTACT :** amira.yacoub@bordeaux.inra.fr

**LIEN UTILE :** www.afpp.net

**BIBLIOGRAPHIE :** La communication dont est extrait cet article est disponible avec sa bibliographie (18 références) dans les Annales de la 5<sup>e</sup> conférence internationale sur les méthodes alternatives de protection des plantes de l'AFPP (lien ci-dessus).

**REMERCIEMENTS** Travaux financés par le programme Casdar du ministère français chargé de l'Agriculture et le CNIV (projet V 1302), le ministère tunisien en charge de la Recherche, la Fondation Poupelain et Biovitis.

## INSECTICIDE

## Vigne



La nature aime à se protéger elle-même

# XenTari®

INSECTICIDE BIOLOGIQUE

GRANULE DISPERSABLE

AGRICULTURE  
CONFORMITÉ  
BIOLOGIQUE

GARANTIE\*  
**3**  
ANS

\* voir l'étiquette

Naturellement efficace !

- Efficace contre les chenilles (piérides, tordeuses et noctuelles)
- Pour une récolte saine et de qualité
- Garantie de conservation 3 ans

PHILAGRO France - SAS au capital de 9 912 500 € - RCS Lyon B 389 150 582 - Parc d'Affaires de Crécy - 2, rue Claude Chappe - 69771 Saint-Didier-au-Mont-d'Or Cedex - Tél. 04 78 64 32 64 - Fax 04 72 53 04 58 - PHILAGRO France est agréé par le Ministère de l'Agriculture sous la référence RH02089 pour la distribution de produits phytopharmaceutiques à destination des utilisateurs professionnels. - XENTARI® marque déposée - AMM. n° 2020241 - (WG) - 35000.0 UFC/g *Bacillus thuringiensis* sp. aizawai - ATTENTION - SGH07 - EUH401, H319. Pour les usages autorisés, doses, conditions, restrictions d'emploi et mises en garde, se référer impérativement à l'étiquette, au site [www.phytodata.com](http://www.phytodata.com) et au site [www.philagro.fr](http://www.philagro.fr). Annule et remplace tout document antérieur de même nature. 02/2015 - [www.accentonic.com](http://www.accentonic.com)

PLUS D'INFOS ?  
[www.philagro.fr](http://www.philagro.fr)



PHILAGRO



**PRODUITS POUR LES PROFESSIONNELS : UTILISEZ LES PRODUITS PHYTOPHARMACEUTIQUES AVEC PRÉCAUTION. AVANT TOUTE UTILISATION, LISEZ L'ÉTIQUETTE ET LES INFORMATIONS CONCERNANT LE PRODUIT.**