

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS
SPÉCIALITÉ ÉCOLOGIE ÉVOLUTIVE, FONCTIONNELLE ET DES
COMMUNAUTÉS

Par Laetitia ANATOLE-MONNIER

**EFFETS DE LA CONTAMINATION CUPRIQUE DES SOLS
VITICOLES SUR LA SENSIBILITÉ DE LA VIGNE À UN
CORTÈGE DE BIO-AGRESSEURS**

Soutenue le 15 décembre 2014

Membres du jury :

M Christophe BERTSCH	Professeur, Université de Haute Alsace	Président, Rapporteur
Mme Catherine KELLER	Professeur, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
M Jérôme MOREAU	Maître de Conférences, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mme Lucia GUERIN-DUBRANA	Maître de Conférences, Bordeaux Sciences Agro	Examinatrice
M Pascal BARATIE	Union des Grands Crus Classés de Graves	Invité
M Denis THIERY	Directeur de recherche, INRA	Directeur de thèse
Mme Laurence DENAIX	Directeur de recherche, INRA	Directrice de thèse

Effets de la contamination cuprique des sols viticoles sur la sensibilité de la vigne à un cortège de bio-agresseurs.

Résumé

La réduction des effets secondaires des produits phytosanitaires sur l'environnement est un enjeu majeur du Grenelle de l'environnement. L'utilisation prolongée du cuivre comme fongicide a entraîné son accumulation dans les sols viticoles. Le cuivre étant phytotoxique, son accumulation dans la plante pourrait modifier la morphologie, la biochimie ou la physiologie des organes végétaux et perturber les interactions vigne-bio-agresseur. Nous avons donc évalué les effets de la contamination cuprique des sols viticoles sur la sensibilité de la vigne à un cortège de bio-agresseurs par une approche plus intégrée de la culture et de son patho-système.

Pour cela, nous avons mesuré les teneurs en cuivre total et disponible des parcelles viticoles. Nous avons exposé au cuivre trois cépages puis nous avons mesuré la distribution du cuivre et ses effets dans la plante. Enfin nous avons évalué l'impact induit pour trois bio-agresseurs de la vigne. Nos résultats montrent que la teneur en cuivre disponible du sol dépend surtout de la teneur total en cuivre (qui résulte de l'historique parcellaire) mais aussi des teneurs en carbone total et en particules fines du sol. L'absorption du cuivre et son transfert vers les parties aériennes varient selon les cépages. Lorsque la contamination cuprique augmente, les interactions vigne-bio-agresseurs sont modifiées : si les effets semblent négatifs pour *Scaphoideus titanus* et *Plasmopara viticola*, la contamination cuprique semble favorable au développement de *Neofusicoccum Parvum*. Ces résultats soulignent la nécessité d'avoir une vision la plus intégrée possible du système, et d'intensifier les interactions de recherches entre l'agronomie et l'écologie évolutive.

Mots clés : Cuivre, sol, bio-agresseurs, vigne, contamination, biodisponibilité, Cabernet Sauvignon, Merlot, 101.14, *Scaphoideus titanus*, *Plasmopara viticola*, *Neofusicoccum Parvum*.

Effects of copper contamination of vineyard soils on the vine sensitivity to several pests.

Abstract

One of the current critical issues in agriculture which was pointed by the 2007 'French Grenelle of the environment' conference is reducing the amount of pesticides used in agriculture and their the side effects on the environment. Prolonged use of copper as a fungicide has led to copper accumulation in vineyard soils. Copper can induce phytotoxicity. Its accumulation in plants modifies the morphology, biochemistry or physiology of plant organs and may disturb the plant-pest interactions. The effects of copper contamination of vineyard soils on the vine sensitivity to the pests received until now a very limited attention. The present work investigates such effects. To carry out this work, we measured the levels of total and available copper in vineyard soils. We contaminated three grapevine cultivars with copper and measured the copper distribution and its effects on the plants. Then, we evaluated the impact induced on three pests of the vine. Our results show that the available copper content in the soil is related to the total copper content (which results from the history of the plot), but also to total carbon and fine soil particles contents. The copper absorption and the copper transferred to the aerial parts of the vine vary according to the cultivar. When copper contamination increased, the vine-pests interactions were modified: a negative effect appeared for *Scaphoideus titanus* and *Plasmopara viticola*, while important copper contaminations promoted the development of *Neofusicoccum parvum*.

These results underscore the need for a more integrated system approach, and the need to intensify interactions between agronomy and evolutionary ecology research.

Keywords: Copper, soil, pests, grapevine, contamination, bioavailability, Cabernet Sauvignon, Merlot, 101.14, *Scaphoideus titanus*, *Plasmopara viticola*, *Neofusicoccum parvum*.

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier mes directeurs de thèse Laurence Denaix et Denis Thiéry qui m'ont accueilli dans leur laboratoire de recherche, ont cru en moi, m'ont fait confiance sur un sujet que d'autres jugeaient improbable... Ils m'ont laissé toute latitude pour réussir cette thèse. Merci pour ces trois belles et intenses années.

Je remercie tous mes collègues des unités SAVE et ISPA pour leur accueil chaleureux, leur aide et les échanges fructueux autour d'un café. Merci à Marie-Christine Medalin, Sonia Perrot et Corinne Sert pour leur soutien administratif, à Sébastien Gambier d'avoir pris soin de mes boutures de vigne, à Jonathan Gerbore et Jean Marc Armand de m'avoir appris à dompter mon Mac, à Jessica Vallance pour son aide en biologie moléculaire et en traitements d'images, à Gwenaëlle Comont d'avoir préparé des souches de *N. parvum* pour moi, à Marie Cécile Dufour, Karine Monceau et Christophe Nguyen pour leurs précieux conseils statistiques, à Cécile Coriou et Sylvie Bussière d'avoir su mener à bien mes analyses malgré les appareils récalcitrants et ma poisse légendaire... Merci à Olivier Bonnard, Lionel Druelle, Gilles Taris, Lionel Jordan-Meille, Mark Backer et Bruno Ringeval pour leur aide bienvenue pour mes prélèvements de terre ! Merci à Isabelle Demeaux, Juliette Poidatz, Emilie Bruez, Fanny Vogelweith et Lionel Delbac pour leurs attentions et leur bonne humeur, à mes colocataires de bureau Wilfried Remus, Suxhian Li et Anthony Bellee pour leur patience. Merci à Christophe Nguyen, Jean Yves Cornu, Dominique Blancard, Agnès Calonnec, Valérie Sappin-Didier, Adrien Rusch, Frédéric Fabre, Marie-France Corio-Costet et Marie Cécile Dufour pour leur bienveillance et leurs conseils avisés.

Merci à Merci aux stagiaires que j'ai encadré, qui m'ont beaucoup appris et qui ont participé avec bonne humeur et enthousiasme à mes travaux Emma Vivien, Aurore Chongaud, Steven Cors, Pierre Adrien Muller et Anthony Lopez. Merci aux autres thésards et post-doc qui ont croisé ma route au cours de ces trois ans, et à qui je souhaite de réussir leurs projets : Courage ! Je remercie tout particulièrement Sylvie Richard, Marie Cécile Dufour, Chloé Delmas, Pascale Roux, Sylvie Bussière et Cécile Coriou qui ont aussi été là dans les moments difficiles, je n'y serais pas arrivée sans leur soutien inconditionnel.

Je souhaite remercier les membres de mon comité de pilotage de thèse qui ont contribué à ma réflexion scientifique et ont apporté une valeur ajoutée certaine à mes travaux : Serge Delrot, Philippe Hinsinger, Christian Gary, Patrice Rey, Valérie Sappin-Didier et Jean Yves Cornu.

Catherine Keller, Christophe Bertsch, Jérôme Moreau, Lucia Guerin-Dubrana et Pascal Baratié m'ont fait l'immense honneur d'évaluer ce travail, qu'ils reçoivent toute ma gratitude pour leur disponibilité.

Je souhaite remercier l'Union des Grands Crus Classés de Graves, co-financeur grâce à laquelle j'ai pu disposer des moyens techniques indispensables à mes investigations. Je

remercie chaleureusement tout le personnel des châteaux viticoles pour leur accueil, leur confiance et leur intérêt pour ce projet.

Je remercie également tous les enseignants de Bordeaux Sciences Agro qui m'ont fait découvrir et aimer le monde de la recherche, sans qui je n'aurais pas emprunté cette voie. Je remercie également le Ministère de l'Agriculture qui a accepté d'investir dans cette thèse en me permettant de transformer trois années d'engagements au service public en doctorat. Je remercie également Sophie Lecalvar, Cyril Kao et Alexandre Pery d'AgroParisTech pour leurs conseils et leur aide dans mes démarches administratives.

Je remercie Marie-Sophie pour ces cours de Pilates, particulièrement déstressant et salutaires en cours de thèse, ainsi qu'à mes compagnons d'efforts pour la convivialité de ces séances !

Merci à toutes les personnes qui de près ou de loin ont manifesté de l'intérêt pour ce projet, ont contribué au bon déroulement de cette thèse et que j'ai oublié de citer.

Je remercie tous mes amis, ma famille et ma belle-famille qui m'ont soutenu tout au long de ce projet. Je remercie plus particulièrement Sophie, Valérie, Mathilde, Thomas, et Manu qui ont suivi de près cette thèse et ses aléas et plus particulièrement ma mère pour son aide précieuse à la maison.

Un très grand merci à mes deux rayons de soleil, Lélia et Aristide pour leur patience et leur bonne humeur tout au long de ces trois ans alors que je n'ai pas toujours pu être disponible pour eux.

Enfin, Je tiens à te remercier Sébastien pour la très grande patience dont tu as su faire preuve, pour ton soutien sans faille, ta présence, tes encouragements et tout particulièrement ses dernières semaines. Je n'y serais pas arrivé sans toi.

Merci !

Définition de quelques termes techniques.

Bougie poreuse : Tube en céramique inerte capable d'extraire la solution du sol par succion. L'extraction se fait par dépression sous vide.

Bouture franche : Bouture non-greffée

CEC (Capacité d'Echange Cationique) : Potentiel d'un sol à retenir les cations susceptibles d'être échangés avec la solution du sol (surtout Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+ , Al^{3+}).

Chancre : Ulcération de l'écorce provoquée par un champignon

Haustoria : Suçoirs formés à partir des hyphes spécialisés du mycélium, qui s'insèrent dans les tissus de la plante hôte pour absorber l'eau et les nutriments contenus dans les cellules.

Hyphe : Chacun des filaments à structure cellulaire dépourvus de chlorophylle et dont l'ensemble forme le mycélium

Lixiviation : Processus au cours duquel l'eau de ruissellement passe au travers du sol en entraînant des substances solubles, des sels ou des ions dissous.

Période de latence : Période entre le premier contact avec l'agent infectieux jusqu'à la période à partir de laquelle l'agent infectieux peut être transmis.

Phytoplasme : Bactérie sans paroi cellulaire rigide, de petite taille, appartenant aux mollicutes.

RESUME	2
ABSTRACT	3
REMERCIEMENTS	4
DEFINITION DE QUELQUES TERMES TECHNIQUES	6
INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES	11
1.1 LE CUIVRE DANS LES SOLS	13
1.1.1 <i>Sources de cuivre dans les sols</i>	13
1.1.2 <i>Utilisation du cuivre en viticulture</i>	14
1.1.3 <i>Teneur en cuivre des sols</i>	16
1.1.4 <i>Le cuivre dans les différents compartiments du sol</i>	18
1.1.4.1 Le cuivre dans la phase solide du sol	19
1.1.4.2 Le cuivre dans la solution du sol	20
1.1.4.3 Influence des échanges sol-solution sur la disponibilité du cuivre	21
1.1.5 <i>Principe de disponibilité et de biodisponibilité</i>	22
1.1.6 <i>Impact des pratiques viticoles sur la disponibilité du cuivre</i>	23
1.1.7 <i>Effet du cuivre sur les organismes du sol</i>	25
1.2 LE CUIVRE DANS LA PLANTE	27
1.2.1 <i>Le cuivre, un oligo-élément pour les plantes</i>	27
1.2.2 <i>Phytotoxicité cuprique</i>	28
1.2.3 <i>Teneurs en cuivre dans la plante</i>	32
1.2.4 <i>Influence de l'activité racinaire sur la disponibilité du cuivre dans la rhizosphère</i>	35
1.2.5 <i>Mécanismes d'absorption et de translocation du cuivre dans la plante</i>	36
1.2.5.1 L'apoplasme, voie principale d'adsorption de Cu ²⁺	36
1.2.5.2 Absorption du cuivre Cu ⁺ par la voie symplasmique	36
1.2.5.3 Translocation du cuivre vers les parties aériennes	38
1.2.6 <i>Stratégies de défense des plantes au risque de phytotoxicité cuprique</i>	39
1.3 QUELQUES GENERALITES SUR LES INTERACTIONS ENTRE LES PLANTES ET LEURS BIO-AGRESSEURS.....	40
1.3.1 <i>Généralités sur les processus de sélection de la plante hôte par les insectes</i>	41
1.3.2 <i>Critères de reconnaissance de la plante hôte par les agents pathogènes</i>	46
1.3.2.1 Infection par un phytoplasme : l'exemple de la vigne.	47
1.3.2.2 Infection par un champignon ou un pseudo-champignon pathogène	49
1.3.3 <i>Systèmes de défenses des plantes contre les bio-agresseurs</i>	50
1.3.3.1 Barrières physiques.....	51
1.3.3.2 Défenses chimiques constitutives.....	52
1.3.3.3 Défenses chimiques induites	54
1.3.4 <i>Facteurs anthropiques influençant les interactions plantes-bio-agresseurs</i>	57
1.4 BIO-AGRESSEURS DE LA VIGNE.....	60
1.4.1 <i>La Cicadelle de la Flavescence dorée Scaphoideus titanus</i>	61
1.4.1.1 Flavescence dorée.....	62
1.4.1.2 Biologie et cycle de développement de <i>S. titanus</i> , insecte vecteur de la Flavescence dorée	63
1.4.2 <i>Le mildiou de la vigne Plasmopara viticola</i>	66
1.4.2.1 Plantes hôtes et symptômes.....	66
1.4.2.2 Biologie et stades de développement de <i>Plasmopara viticola</i>	68
1.4.3 <i>Les dépérissements dus à Botryosphaeria sp.</i>	71
1.4.3.1 Plantes hôtes et symptômes.....	71
1.4.3.2 Biologie et stade de développement de <i>Botryosphaeria sp.</i>	72
1.5 LES HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	74
CHAPITRE 2 : EVALUATION DE LA DISPONIBILITE DU CUIVRE DANS LES SOLS VITICOLES	77
2.1 MATERIELS ET METHODES	79
2.2 EVALUATION DE LA CONTAMINATION EN CUIVRE DES SOLS VITICOLES DE PESSAC-LEOGNAN	84
2.2.1 <i>Résultats</i>	84
2.2.1.1 Caractéristiques physico-chimiques des sols étudiés de Pessac-Léognan	84
2.2.1.2 Teneur en cuivre total des couches H1 et H2	86

2.2.1.3	Principales caractéristiques expliquant la teneur en cuivre totale de l'horizon de surface.....	89
2.2.2	<i>Discussion</i>	92
2.3	DETERMINATION DE LA DISPONIBILITE EN CUIVRE DE L'HORIZON DE SURFACE DES PARCELLES VITICOLES DE PESSAC-LEOGNAN	94
2.3.1	<i>Résultats</i>	94
2.3.1.1	Teneur en cuivre mobile des sols viticoles de Pessac-Léognan (extrait à l'EDTA).....	94
2.3.1.2	Teneur en cuivre dans la solution du sol.....	95
2.3.1.3	Concentration en cuivre disponible mesuré par le capteur passif DGT	97
2.3.2	<i>Discussion</i>	99
CHAPITRE 3	: EFFETS D'UNE CONTAMINATION CUPRIQUE MODEREE SUR LA VIGNE.....	102
3.1	DISTRIBUTION DU CUIVRE ET DU FER DANS LA VIGNE SELON LES CEPAGES ET EN FONCTION DU NIVEAU DE CONTAMINATION CUPRIQUE DU SUBSTRAT.....	104
3.2	CONSEQUENCES D'UNE CONTAMINATION CUPRIQUE SUR LE METABOLISME DE LA PLANTE : ETUDE DE LA COMPOSITION DE LA SEVE	121
3.2.1	<i>Matériels et méthodes</i>	121
3.2.2	<i>Résultats</i>	124
3.2.2.1	Influence de la contamination cuprique sur la teneur en sucres dans la sève des feuilles de Cabernet Sauvignon	124
3.2.2.2	Influence de la contamination cuprique sur la teneur en acides aminés dans la sève des feuilles de Cabernet Sauvignon	124
3.2.3	<i>Discussion</i>	126
CHAPITRE 4	: EFFETS DU CUIVRE CIRCULANT DANS LA VIGNE SUR QUELQUES BIO-AGRESSEURS	130
4.1	EFFETS D'UNE CONTAMINATION CUPRIQUE DE LA VIGNE SUR L'ATTRACTIVITE DE <i>SCAPHOIDEUS TITANUS</i>	132
4.1.1	<i>Matériels et méthodes</i>	132
4.1.2	<i>Résultats</i>	134
4.1.2.1	Choix de <i>S.titanus</i> entre des boutures de Cabernet Sauvignon exposées à différentes concentrations de cuivre	134
4.1.2.2	Répartition de <i>S. titanus</i> entre les étages foliaires des boutures de vigne en fonction de leur exposition au cuivre	135
4.1.2.3	Importance de l'origine géographique des insectes	136
4.1.3	<i>Discussion</i>	136
4.2	EFFETS D'UNE EXPOSITION CUPRIQUE DE LA VIGNE SUR LE DEVELOPPEMENT DE <i>PLASMOPARA VITICOLA</i>	139
4.2.1	<i>Matériels et méthodes</i>	139
4.2.2	<i>Résultats</i>	142
4.2.2.1	Effet d'une exposition cuprique des boutures de Cabernet Sauvignon et de Merlot sur la croissance des colonies de <i>P. viticola</i>	142
4.2.2.2	Effets d'une exposition au cuivre des deux cépages sur l'intensité de sporulation de <i>P. viticola</i>	143
4.2.3	<i>Discussion</i>	144
4.3	EFFETS DE L'EXPOSITION AU CUIVRE DE LA VIGNE SUR LES MALADIES DE DEPERISSEMENT DUES AUX <i>BOTRYOSPHAERIA SP.</i> : ETUDE DU CAS DE <i>NEOFUSICOCCUM PARVUM</i>	145
4.3.1	<i>Matériels et méthodes</i>	146
4.3.2	<i>Résultats</i>	150
4.3.2.1	Teneur en cuivre dans le sol.....	150
4.3.2.2	Teneur en cuivre dans la vigne.....	150
4.3.2.3	Effets d'une exposition au cuivre de la vigne sur la taille des nécroses produites par <i>N. parvum</i>	151
4.3.2.4	Effets d'une exposition au cuivre sur les communautés fongiques endophytes de la vigne	152
4.3.2.5	Effets d'une exposition au cuivre sur les communautés bactériennes endophytes de la vigne	155
4.3.3	<i>Discussion</i>	158
CHAPITRE 5	: CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	163
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	171
	ANNEXES	197

Introduction

L'agriculture doit permettre de récolter régulièrement des produits agricoles de qualité, en quantité suffisante tout en préservant les ressources naturelles et en respectant l'environnement. L'utilisation massive de pesticides a permis d'obtenir d'une part une autosuffisance alimentaire en France malgré la croissance de la population, d'autre part, de pallier à la propagation des bio-agresseurs. Les effets secondaires de ces produits sur les écosystèmes cultivés ont également été mis en évidence, notamment leur impact négatif sur l'environnement. La demande sociétale française et européenne vise aujourd'hui à réduire l'impact des pratiques agricoles sur l'environnement, comme l'illustrent les perspectives du Grenelle de l'environnement, du plan Ecophyto 2018, ainsi que les perspectives de recherches de l'INRA pour la prochaine décennie. En conséquence, un des enjeux primordiaux actuels en agriculture est la réduction de l'emploi des produits dits phytosanitaires ou de leurs résidus dans les productions végétales, et de leur accumulation dans les sols agricoles et plus généralement dans l'environnement. C'est particulièrement vrai en culture fruitière et notamment en viticulture, grande consommatrice de fongicides. De plus, la filière viticole elle-même ressent le besoin de réduire les intrants phytosanitaires dont le cuivre. Suite à la suppression de nombreuses matières actives phytosanitaires, à la constatation de présence de résidus pesticides dans l'environnement, la profession a pris conscience de la problématique environnementale et souhaite transmettre un patrimoine environnemental sain aux générations futures.

La viticulture est l'une des productions françaises les plus consommatrices de produits phytosanitaires, notamment de fongicides. L'utilisation de pesticides en vigne est ancienne puisque des espèces invasives de bio-agresseurs ont été introduites accidentellement en France dès le milieu du XIX^{ème} siècle, et plus particulièrement suite à la crise phylloxérique. Les fongicides cupriques sont parmi les premiers à avoir été utilisés, et leur usage perdure aujourd'hui. Ils font d'ailleurs partie des produits autorisés en agriculture biologique bien que leur application intensive ne soit pas sans conséquence pour l'environnement. Plusieurs études ont mis en évidence une accumulation importante du cuivre dans les sols viticoles. Des symptômes de phytotoxicité cupriques ont été décrits pour de nombreuses cultures mises en place après l'arrachage de la vigne sur ces parcelles contaminées. Des difficultés de reprises des jeunes plants de vigne ont également été signalés. En cas de phytotoxicité cuprique, des modifications morphologiques et de composition chimique de la plante, tant pour les organes racinaires que pour les organes aériens ont été observées. Pour autant, aucune étude n'a mis en évidence les premiers effets délétères du cuivre sur la vigne lors d'une contamination cuprique modérée. Cependant, l'interaction entre la vigne et le bio-agresseur pourrait en être modifiée si les bio-agresseurs sont sensibles à ces premières modifications dans la plante. De nombreuses études ont été menées pour étudier l'impact direct d'un traitement cuprique sur les bio-agresseurs ainsi que sur les relations tri-trophiques au sein du vignoble, mais peu s'intéressent aux effets de cette contamination cuprique via la plante dans les interactions vigne-bio-agresseur.

L'originalité de cette thèse est d'analyser les effets de la contamination cuprique des sols viticoles sur la sensibilité de la vigne à un cortège de bio-agresseurs par une approche plus intégrée de la culture et de son patho-système. Pour mener à bien ce travail, nous avons sélectionné quelques pathogènes et insectes vecteurs agissant sur les parties aériennes de la vigne et construit une collaboration entre deux unités de recherches INRA (l'une spécialisée sur les bio-agresseurs de la vigne, l'autre sur l'analyse des éléments traces dans le sol et leur transfert dans la plante), et des viticulteurs (Union des Grands Crus Classés de Graves).

Chapitre 1 : Etat des connaissances

La culture de la vigne a débuté au Proche-Orient il y a 4000 ans, gagnant ensuite le pourtour méditerranéen jusqu'en Italie sous l'action commerciale des grecs. Puis elle a été introduite lors des conquêtes romaines en France et dans le reste de l'Europe jusqu'en Grande Bretagne. L'extension de la culture de la vigne s'est poursuivie vers des régions plus septentrionales sous l'action de l'Eglise, à la chute de l'empire romain. Avec la découverte de nouveaux mondes et le développement des échanges commerciaux, la culture de la vigne s'est étendue vers les régions dont les températures moyennes annuelles sont situées entre 10 et 20°C, propices à sa culture (figure 1).

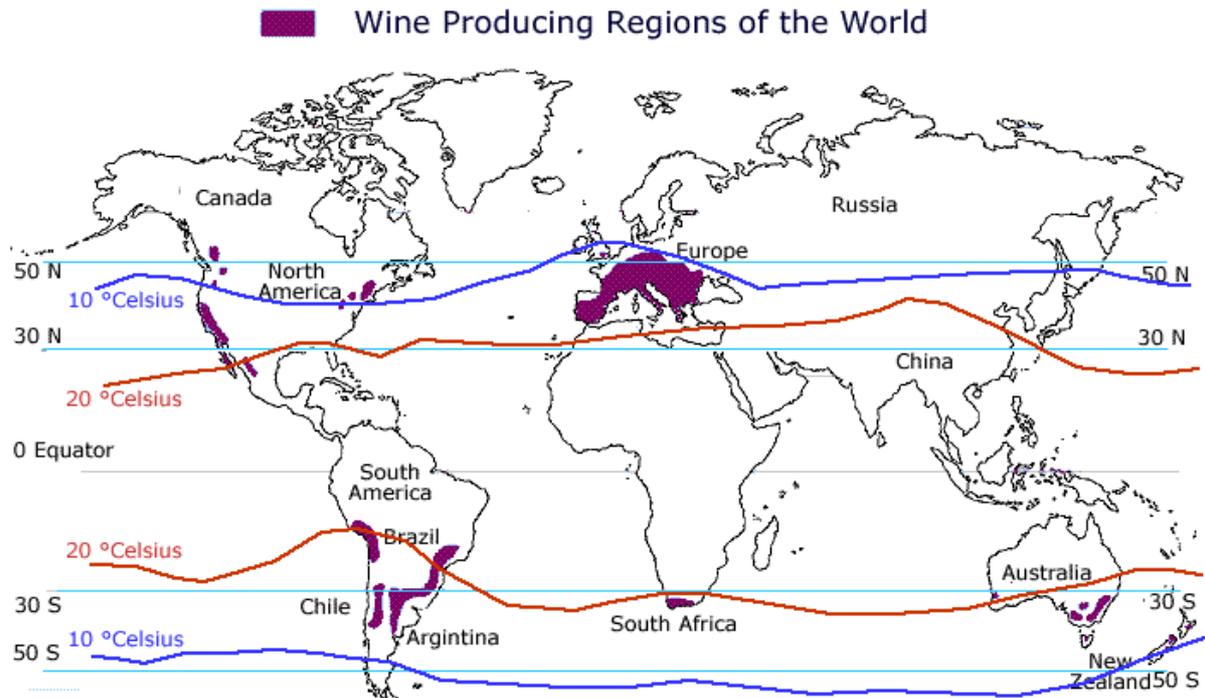


Figure 1 : Principales régions de production viticole dans le monde (le vin pas à pas.com)

L'essor des échanges de matériel végétal au 19^{ème} siècle, et en particulier la replantation d'environ 900.000 ha en France à l'aide de porte-greffes originaires d'Amérique, a également favorisé l'introduction et la propagation accidentelle de nombreux bio-agresseurs. Ainsi, l'introduction accidentelle du phylloxera en 1868 en provenance d'Amérique du Nord a détruit une grande partie du vignoble européen et provoqué une crise sociale de la filière de production. En 1878, suite aux travaux de C.V. Riley et J.E. Planchon (Carton et al., 2007), deux porte-greffes résistants au phylloxera *Vitis riparia* et *Vitis rupestris* furent importés d'Amérique du Nord. C'est ainsi qu'ont été introduit accidentellement en France, de nouveaux pathogènes majeurs de la vigne comme *Erysiphe necator* agent de l'oïdium ou *Plasmopara viticola* responsable du mildiou. Ils se sont ensuite rapidement étendus au reste de l'Europe et aux autres vignobles mondiaux lorsque les conditions climatiques leur étaient favorables.

Le genre *Vitis* appartient à l'ordre des Rhamnales, de la famille des Vitacées. On distingue deux sous-genres *Muscadinia* et *Euvitis*. *Euvitis* comprend 70 espèces dont une trentaine originaire d'Amérique comme *V. labrusca*, *V. aestivalis*, *V. riparia*, *V. cinerea*, *V. rupestris*, et *M. rotundifolia* ; une trentaine sont originaires d'Asie, une dizaine d'origine tropicale et une seule d'origine européenne *V. vinifera* (Zecca et al., 2012 cité par Rouxel, 2012). La sous-espèce sauvage *sylvestris* de *V. vinifera* a donné la sous-espèce *estiva* cultivée en Europe.

Longtemps chaque région viticole avait ses propres cépages adaptés au terroir. Avec la mondialisation, le choix des cépages vinifiés tend à s'uniformiser : de nombreux cépages de *V. vinifera* comme le Cabernet Sauvignon, le Merlot, le Chardonnay et le Syrah ont été implantés en Californie, au Chili ou à Taïwan. Cette uniformisation progressive du vignoble dans le monde tend à le rendre également plus sensible aux mêmes cortèges de pathogènes et l'usage de traitements fongicides comme la bouillie bordelaise s'est généralisé.

Si mon travail de doctorat repose essentiellement sur une région viticole française, la problématique qui y est développée concerne également d'autres régions viticoles du monde (Australie, Californie, Brésil, Afrique du Sud, Chine, Turquie, Italie, Espagne...).

1.1 Le cuivre dans les sols

1.1.1 Sources de cuivre dans les sols

Le cuivre est naturellement présent dans les roches et les sols : les sols développés sur des roches d'origine sédimentaire contiennent plus de cuivre que les sols développés sur des roches de type schistes ou granites (Fernandez-Calvino et al., 2008), les roches les plus concentrées en cuivre sont les roches d'origine volcanique (Kabata-Pendias, 2010). Les minéraux cupriques viennent soit de la roche parentale soit se forment lors de processus pédologiques par substitution à d'autres cations métalliques ou par co-précipitation avec des carbonates magnésiens ou calciques, ou encore avec des oxydes de fer, de manganèse et d'aluminium (McBride, 1981, Cetois et al., 2003). Ainsi, suivant la concentration initiale de la roche mère et en fonction des processus pédogéochimiques, le fond pédogéochimique en cuivre des sols va varier.

Les concentrations actuelles de cuivre dans des sols sont le résultat de l'accumulation de différentes sources. Ainsi, les retombées atmosphériques qui se déposent sur les sols peuvent avoir des origines naturelles telles que l'érosion éolienne, les éruptions volcaniques, les sels marins et les feux de forêts ou des origines anthropiques comme les activités industrielles, minières, agricoles et l'incinération de déchets (Tiller et Merry, 1981, Baker et Senft, 1995, Bourrelier et Berthelin, 1998). Par exemple, les retombées atmosphériques moyennes sont de 9 g/ha/an en France (Sogreah, 2007). Aux retombées atmosphériques viennent s'ajouter dans les sols agricoles des apports anthropiques liés aux pratiques agricoles : fertilisation, épandages de déjections animales, de boues ou de composts, chaulage et traitements phytosanitaires. En France, une étude de l'Ademe a montré que les flux majoritaires de cuivre à la parcelle étaient les déjections animales pour 53% et les traitements phytosanitaires pour 34%. Les boues et composts n'apportent que 5% des flux, ce qui correspond à l'échelle du territoire au flux arrivant via les retombées atmosphériques (Sogreah, 2007). Les apports de cuivre par épandage de boues de station d'épuration sont réglementés par l'arrêté du 8 janvier 1998, limitant l'apport à des boues dont la concentration est inférieure à 1000 mg/kg MS pour un flux sur 10 ans inférieur à 15 kg Cu/ha.

Dans le cas des sols viticoles, ce sont essentiellement les apports de pesticides qui sont à l'origine de l'accumulation du cuivre. La même étude montre que dans un département essentiellement viticole comme la Gironde, plus de 90% des flux de cuivre à la parcelle sont attribués à l'usage de pesticides.

1.1.2 Utilisation du cuivre en viticulture

Historique

En France, l'utilisation du cuivre en tant que fongicide contre le mildiou remonte à l'invention de la bouillie bordelaise ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$) dans le Médoc en 1882 par Millardet. Auparavant, il était déjà utilisé en viticulture, badigeonné sur les échelas afin d'en prolonger la durée de vie (Branas, 1984). Grâce à son action polyvalente, son utilisation en tant que produit de contact sur les parties aériennes, s'est rapidement généralisée pour lutter contre les maladies cryptogamiques en vigne : Le cuivre permet de combattre efficacement le mildiou, l'anthracnose maculée, le black rot, la nécrose bactérienne mais également dans une moindre mesure le rougeot parasitaire, la pourriture grise et a un petit effet sur l'oïdium en empêchant la formation des cléistothèces (Branas, 1984). Il est aussi utilisé en arboriculture (pommier, pêcher, poirier, cerisier, agrumes, caféier, olivier, kiwis, fruits à coques), en maraichage (pomme de terre, tomates, fraises, choux, haricots, artichaut, céleri, poireau) mais également pour le coton, le houblon, la chicorée ou les rosiers (e-phy). L'ion cuivrique Cu^{2+} possède des propriétés antifongiques et bactéricides, capables d'altérer la structure des communautés et les processus microbiens. C'est également un oligo-élément qui peut devenir phytotoxique à haute dose pour les algues et les végétaux. L'efficacité antifongique et bactéricide du cuivre, à titre préventif uniquement, intervient à plusieurs niveaux : le cuivre bloque les processus respiratoires, freine la biosynthèse des protéines et ralentit les transferts d'éléments en diminuant l'activité membranaire (Rousseau, 1995). Il est aussi capable de catalyser la production de radicaux libres qui sont de puissants oxydants (Michaud et al., 2007). « Millardet et Gayon ont montré que le cuivre empêchait la germination des conidies et la pénétration des filaments dans les feuilles et provoquait la mort des zoospores de *Plasmopara viticola* » (Branas, 1984). Toutefois, lorsque l'agent pathogène est déjà présent dans la feuille, le cuivre est alors inactif.

En vigne, avant la Seconde Guerre mondiale, la dose de cuivre apportée était de l'ordre de 20 à 50 kg/ha/an (Branas, 1984). La seconde guerre mondiale ayant entraîné une pénurie de cuivre, de nombreux produits de synthèse se sont développés après la guerre tandis que les pulvérisateurs se sont perfectionnés favorisant la diminution des doses. De même, des progrès ont été faits pour rendre le cuivre efficace à plus petites doses grâce à de nouvelles formulations intégrant des adjuvants de plus en plus performants. De fait, la dose appliquée de cuivre en viticulture a considérablement diminué aujourd'hui. Or, comme des résistances à certains pesticides de synthèse sont apparues, les traitements à base de cuivre sont toujours utilisés que ce soit en agriculture biologique, raisonnée ou conventionnelle.

Les réglementations européennes et françaises deviennent de plus en plus strictes sur l'utilisation du cuivre comme produit phytosanitaire : cet élément est autorisé en tant que produit phytosanitaire par la directive européenne 2009/37/CE ; il est également autorisé en Agriculture biologique par le règlement CE 889/2008. En France, Italie et Espagne, son usage est autorisé actuellement avec une dose de 6 kg/ha/an. D'autres pays européens sont encore plus restrictifs : Allemagne, Autriche et Suisse n'autorisent qu'une dose de 3-4 kg/ha/an (Dagostin et al., 2011).

Formulations

Il existe de nombreuses formulations de fongicides à base de cuivre. La bouillie bordelaise, la plus couramment utilisée, est le résultat de la neutralisation d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) par du lait de chaux (Ca(OH)_2). Il est nécessaire de neutraliser

l'acidité du sulfate de cuivre pour ne pas brûler les feuilles. La composition exacte de la bouillie bordelaise reste souvent difficile à connaître, car la nature de ses constituants peut varier. Il est possible de trouver du gypse ou du plâtre pour les composés calciques et différents sels de sulfates de cuivre issus du traitement du cuivre par l'acide sulfurique. En France, les bouillies bordelaises commercialisées contiennent 17 à 50 % de cuivre selon les spécialités (e-phy).

Aujourd'hui, le cuivre est également utilisé sous d'autres formes (tableau 1) comme l'hydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$ et l'oxychlorure de cuivre $\text{CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$ qui sont moins solubles et présentent moins d'effets secondaires pour les plantes car ils ne provoquent pas de brûlures des feuilles (Pietrzak et McPhail, 2004).

Tableau 1 : Formulations à base de cuivre autorisées en vigne en France en 2014

Substance active	Usage autorisé	Association possible avec d'autres substances actives
Hydroxyde de cuivre	Mildiou, oïdium, bactérioses	seul ou associé au soufre triture
Oxychlorure de cuivre	Mildiou, oïdium	Seul ou associé au cymoxanil, à l'iprovalicarbe, au mancozèbe, au mandipropanide, au soufre triture
Oxyde cuivreux	Mildiou, bactérioses	Seul
Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Mildiou, excoriose, bactérioses	Seul ou associé au folpel, au manèbe, au cymoxanil, au mancozèbe
Sulfate tetracuvrique et tricalcique	Mildiou	Seul
Tallate de cuivre	Adjuvant de bouillie	

L'usage du cuivre sous la forme de chélate de cuivre (EDTA), d'acétate de cuivre, de carbonate de cuivre, d'hydrocarbonate de cuivre, d'hydroxyde de cuivre-metalaxyl, d'oxyde cuivrique, de béta-cyclodextrine-hydroxyde de cuivre, ou de chlorure cuivreux n'est pas ou n'est plus autorisé en France en 2014 (e-phy) du fait des effets non intentionnels secondaires de ces formulations sur l'environnement.

Application

La solution de cuivre est appliquée sur la plante par pulvérisation sur les parties aériennes. L'application est renouvelée régulièrement, du fait du cycle rapide des maladies (6 jours environ pour le mildiou), du renouvellement rapide des organes sensibles (jeunes feuilles) et des capacités de lessivage du produit. Le nombre de traitements cupriques appliqués varie en fonction de l'itinéraire cultural choisi (conventionnel ou biologique), en fonction de la sensibilité du cépage à la maladie et des conditions climatiques. Trois traitements en moyenne sont nécessaires aujourd'hui (stade pousses 10-15 cm, après floraison et au début de la véraison). Un seul traitement annuel peut être réalisé si d'autres pesticides de synthèse ont été utilisés en amont, tandis que 8 traitements cupriques peuvent être nécessaires les années humides. En effet, lors de pluies supérieures à 2 mm, jusqu'à 40 % du produit cuivrique est lessivé (Molot, 2003) et entraîné vers le sol. Initialement, le cuivre pulvérisé sur les feuilles de vigne est en grande partie insoluble. Il réagit avec le CO_2 dissous dans l'eau pour former la malachite (CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$), sel de cuivre soluble qui progressivement libère les ions cuivriques Cu^{2+} possédant des propriétés antifongiques et bactéricides (Chaignon, 2001).

Le cuivre issu de la bouillie bordelaise se trouve accumulé dans le sol d'une part, directement à cause des traitements pesticides dont la pulvérisation aérienne peu précise entraîne des dépôts directement sur le sol, d'autre part, suite au lessivage de ces mêmes produits lors d'épisodes pluvieux, enfin lors de la chute des feuilles traitées ou le broyage et l'incorporation des sarments dans le sol (Pietrzak et McPhail, 2004). Malgré l'évolution des pratiques culturales et le raisonnement des apports aujourd'hui, on constate une accumulation importante du cuivre dans les sols viticoles après un peu plus d'un siècle d'utilisation.

1.1.3 Teneur en cuivre des sols

Les mesures effectuées montrent que 90% des sols de France ont des teneurs totales comprises entre 5 et 36 mg Cu/kg de sol, avec une teneur moyenne de 20 mg Cu/kg de sol et un maximum de 508 mg Cu/kg (GIS Sol, 2011). A contrario, des concentrations de 1000 à 8700 mg Cu/kg ont été mesurées dans des sols situés à proximité de sites d'exploitation minière et d'industries métallurgiques (Kabata-Pendias et Pendias, 1992, Vulkan et al., 2000).

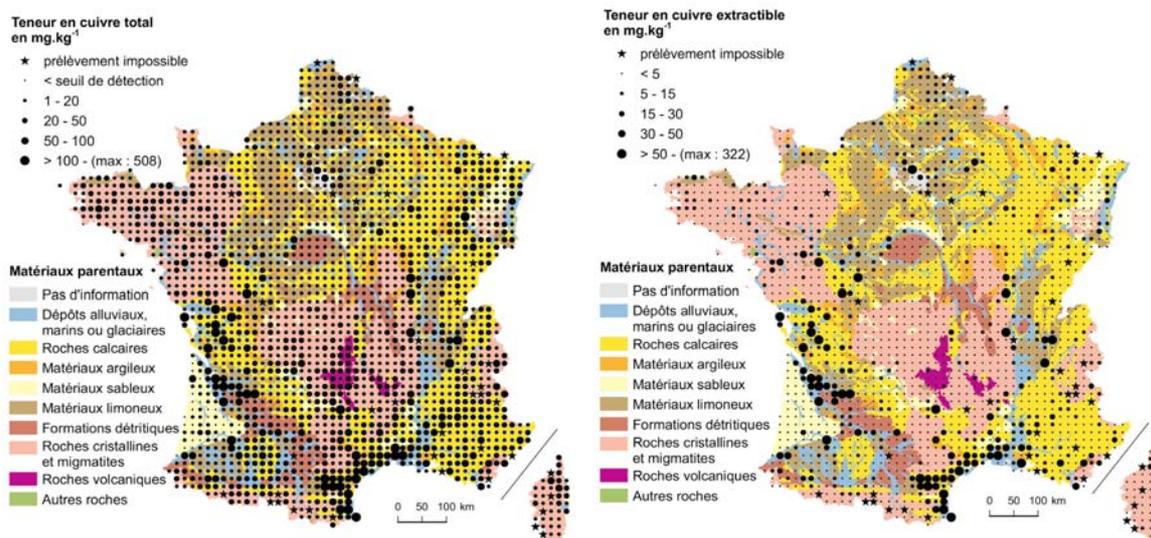


Figure 2: Répartition du cuivre dans les horizons de surface (0-30 cm) des sols français en teneur totale (A) ou extraite à l'EDTA (B) (Gis Sol, 2011)

La carte de répartition sur le territoire français des teneurs en cuivre total du sol (horizon 0-30 cm) mesurées par le programme RMQS (Réseau de Mesure de la Qualité des Sols) en 2011, montre que les régions les plus concernées par l'accumulation de cuivre dans les sols sont les zones viticoles et les zones d'élevage intensif comme la Bretagne (figure 2A). Les zones où les concentrations de cuivre extraites à l'EDTA (éthyle diamine tétra-acétique) sont les plus importantes, correspondent aux zones viticoles ou arboricoles présentant des conditions favorables au développement des pathogènes contre lesquels les traitements cupriques ont été particulièrement utilisés (figure 2B). Cette différence de répartition s'explique par la plus grande disponibilité du cuivre apporté sous forme de sels.

Dans les régions viticoles françaises où les conditions climatiques sont plus favorables au mildiou (précipitations printanières fréquentes) comme la Champagne ou le Bordelais, il y a eu davantage de traitements cupriques, ce qui explique qu'elles aient des teneurs en cuivre total plus élevées que d'autres régions viticoles comme la Bourgogne ou Midi-Pyrénées (tableau 2). Toutefois, il existe aussi de grandes disparités des teneurs cupriques dans les sols au sein même d'une région viticole qui dépend de l'ancienneté de l'activité viticole sur la parcelle (Fernandez-Calvino et al., 2008) et des différences entre les itinéraires culturaux mis

en place par les viticulteurs comme le recours ou non à des pesticides de synthèse pour lutter contre le mildiou.

Tableau 2: Teneurs en cuivre des sols viticoles français

Région viticole	Teneur Cu total en mg Cu/kg sol	Source
Alsace	243-400 mg/kg	Probst et al., 2008, Bravin, 2008
Beaujolais	191 mg/kg	Jacobson et al., 2005
Bourgogne	71-332 mg/kg	Parat et al., 2002
Bordeaux	17-491 mg/kg	El Hadri et al., 2012, Jacobson et al., 2005
Champagne	149-519 mg/kg	Besnard et al., 2001, Chopin, 2008
Languedoc-Roussillon	22-1030 mg/kg	Brun et al., 2001, Chaignon et al., 2003, Michaud et al., 2007
Midi-Pyrénées	28-166 mg/kg	Regourd, 2000
Vallée de la Loire	280 mg/kg	d'après Bravin, 2008
Vallée du Rhône	320 mg/kg	d'après Bravin, 2008

Le même constat a été fait dans d'autres régions viticoles du monde (tableau 3). Ainsi les vignobles du nouveau monde, plus récents, présentent moins d'accumulation de cuivre. En effet, les traitements cupriques y sont également plus récents et sont davantage raisonnés que les premiers apports qui eurent lieu à la fin du 19^{ème} siècle dans les vignobles européens. En outre, certains d'entre eux comme le Chili, du fait de leurs conditions climatiques, sont moins touchés par le mildiou et ne nécessitent pas de traitements cupriques. De plus, certains de leurs cépages sont davantage résistants au mildiou. Or, la maladie tend à se propager progressivement vers ces régions, du fait du réchauffement climatique tandis que les cépages européens plus sensibles comme le Merlot, le Cabernet Sauvignon ou le Chardonnay y sont progressivement implantés. L'utilisation de traitements cupriques pourrait donc s'y généraliser.

Tableau 3: Maximales des teneurs en cuivre total mesurées dans les sols viticoles du monde

Pays	Teneur totale des sols viticoles en mg Cu/kg sol	Source
Afrique du Sud	55 mg/kg	Eijsackers et al., 2005
Allemagne	522 mg/kg	Kabata Pendias et Pendias, 1992 Scholl et Enkelmann, 1984, Cetois et al., 2003
Australie	223-250 mg/kg	Pietrzak et Mcphail, 2004, Whightwick et al., 2008
Brésil	660-3200 mg/kg	Mirlean et al., 2007, Casali et al., 2008
Bulgarie	72 mg/kg	Angelova et al., 1999
Canada	77 mg/kg	Franck et al., 1976 cité par Komarek et al., 2010
Croatie	252-700 mg/kg	Romic et al., 2004, Vitanovic et al., 2008
Espagne	549-583 mg/kg	Arias et al., 2005, Fernandez-Calvino et al., 2008
Etats-Unis	142 mg/kg	Taschenberg et al., 1961 cité par Mackie et al., 2012
Géorgie	398 mg/kg	Narimanidze et Bruckner, 1999 cité par Komarek et al., 2010
Inde	131 mg/kg	Prasad et al., 1984
Italie	545-945 mg/kg	Deluisa et al., 1996, Cattani et al., 2006
Nigéria	68 mg/kg	Udo et al., 1979 cité par Agbenin et Henningsen, 2004
Nouvelle Zélande	259 mg/kg	Morgan et Taylor, 2004
Portugal	574 mg/kg	Pessanha et al., 2010 cité par Mackie et al., 2012
République de Chine	100-105 mg/kg	Lai et al., 2010, Li et al., 2007
République tchèque	140-168 mg/kg	Ash et al., 2012, Komarek et al., 2008
Serbie	432 mg/kg	Ristic et al., 2006 cité par Mackie et al., 2012
Slovénie	364 mg/kg	Pociecha et Lestan, 2009 cité par Komarek et al., 2010
Suisse	489 mg/kg	Celardin et al., 2004 cité par Komarek et al., 2010
Thaïlande	238 mg/kg	Joannon et al., 2001 cité par Komarek et al., 2010
Ukraine	25 mg/kg	Vystavna et al., 2013

La teneur en cuivre est plus élevée dans les premiers centimètres du sol ou le premier horizon puis décroît fortement avec la profondeur (Brun et al., 1998, Komarek et al., 2008, Villanneau et al., 2008). En effet, le cuivre s'accumule surtout dans les horizons superficiels du sol (Brun et al., 1998, Pietrzak et McPhail, 2004) car il y est rapidement complexé, notamment par la matière organique. Par conséquent, le cuivre pollue peu les horizons profonds ou les eaux souterraines par lixiviation (Delas, 1963) bien qu'il existe un risque de contamination des eaux de ruissellement (Robert, 1995). Par contre, l'érosion éolienne et le lessivage des sols cultivés entraînent une accumulation du cuivre par dépôt sédimentaire ce qui explique la concentration élevée trouvée parfois dans les eaux drainées à proximité des surfaces cultivées (Aldrich et al., 2002, Xue et al., 2003, Van Hullebusch et al., 2003, Banas et al., 2010).

1.1.4 Le cuivre dans les différents compartiments du sol

Dans le sol, le cuivre se complexe très rapidement à de nombreux éléments qui vont limiter sa mobilité. On distingue généralement la phase solide du sol de la solution du sol (figure 3), le cuivre étant majoritairement présent dans la phase solide du sol. La répartition du cuivre entre les différents compartiments du sol dépend de la composition minérale et organique des sols et de leurs propriétés physicochimiques comme la température, le pH, et l'humidité (H).

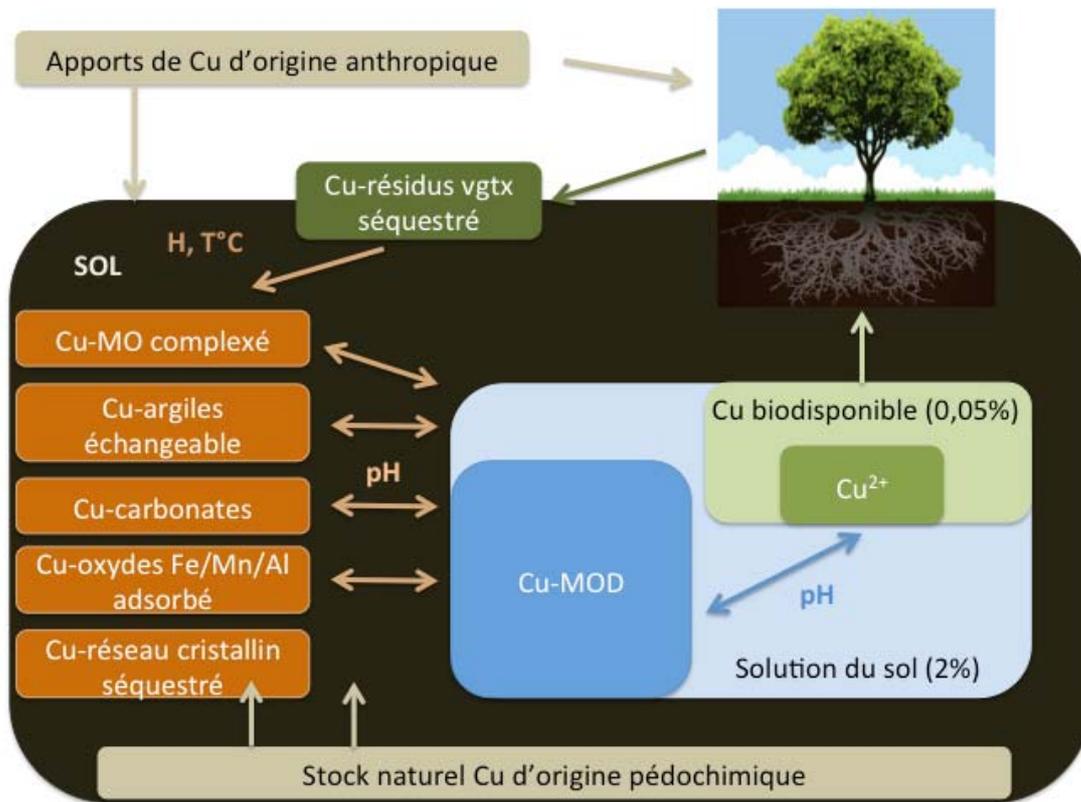


Figure 3: Différentes formes de cuivre dans le sol en fonction des échanges entre les compartiments du sol (MOD = matières organiques dissoutes, H=humidité)

1.1.4.1 Le cuivre dans la phase solide du sol

Dans la phase solide du sol, le cuivre se répartit entre plusieurs compartiments. Il peut être complexé à la matière organique, aux oxydes et hydroxydes de fer, de manganèse ou d'aluminium (figure 3). Il peut aussi être sorbé sur les sites négatifs portés par les argiles, ou précipité notamment avec des carbonates, ou inclus dans des minéraux. Le cuivre sorbé sous toutes ces formes peut passer en solution sous l'influence de facteurs physico-chimiques. Le cuivre prisonnier du réseau cristallin est très peu mobile compte tenu du temps nécessaire à l'altération des roches. Le cuivre peut également être séquestré momentanément dans les résidus végétaux ou animaux, il sera libéré lors de leur décomposition et de leur minéralisation. La rétention du cuivre dans la phase solide du sol est due principalement aux matières organiques et aux hydroxydes (Bravin, 2008), et dépend fortement du pH (figure 3). Si la fraction de cuivre lié aux oxydes de fer et d'aluminium dépend peu de la profondeur, la fraction liée à la matière organique décroît fortement au-delà de 45 cm de profondeur (Pietrzak et Mcphail, 2004).

La matière organique peut ainsi complexer de 15 à 52 % du cuivre total du sol (Pietrzak et Mcphail, 2004, Fernandez-Calvino et al., 2008). L'adsorption sur les différents groupements fonctionnels des matières organiques se fait généralement en faveur des groupements carboxylique et phénolique. S'il peut être en compétition avec d'autres cations pour ces groupements, le cuivre présente la meilleure affinité dans les sols acides. A pH 5, le classement par affinité des métaux divalents vis-à-vis des matières organiques donne : $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ (Schnitzer et Skinner, 1966 cité par Bravin, 2008).

Ainsi un excès de cuivre dans le sol peut gêner la fixation d'autres cations sur la matière organique et ainsi favoriser leur lixiviation.

La complexation avec les hydroxydes ou oxyhydroxydes mobilise davantage d'énergie et peut être covalente dans certains cas. L'affinité varie selon les hydroxydes (Kinniburgh et al., 1976, McKenzie, 1980) :

Oxyhydroxydes Fe amorphes	$Pb^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Mg^{2+}$
Oxyhydroxydes Al	$Cu^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Mg^{2+}$
Oxyhydroxydes Mn	$Pb^{2+} > Cu^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$

L'affinité des métaux est particulièrement forte pour les oxyhydroxydes de Mn qui sont capables d'adsorber des quantités de métal cent fois supérieures à celles adsorbées par des oxyhydroxydes de Fe (McKenzie, 1980).

Le cuivre peut aussi se fixer par liaison électrostatique sur les constituants portant des charges négatives. L'échange d'ions étant non spécifique, le cuivre est alors en compétition avec tous les cations présents en solution, notamment les deux cations majoritaires dans la plupart des sols : le proton, ce qui explique en partie l'effet du pH et, le calcium, ion majoritaire dans les sols calcaires. Cette compétition peut faciliter la mobilité du cuivre vers la solution de sol (Bravin 2008). La CEC (capacité d'échange cationique) est la capacité d'un sol à un pH donné, à retenir les cations sur ses charges négatives. Ainsi, un sol dont la CEC sera importante pourra fixer plus de cuivre par échange d'ion (Brun et al., 2001).

Suivant les conditions physicochimiques du sol, le cuivre peut aussi précipiter avec des anions sulfures, carbonates et hydroxydes (Kabata Pendias et Pendias, 1992).

1.1.4.2 Le cuivre dans la solution du sol

La fraction de cuivre présente dans la solution du sol est faible, de l'ordre de 1 à 2% de la teneur en cuivre totale du sol (Sauvé et al., 1998, Agbenin et Felix-Henningsen, 2004). Dans la solution du sol, on trouve le cuivre sous quatre formes:

- le cuivre chélaté à de la matière organique dissoute tels que les acides aliphatiques, les acides aminés, les acides phénoliques, les peptides, les protéines, les polysaccharides ou les acides humiques et fulviques (Sposito, 1989 ; Stevenson, 1994, Kabata Pendias, 2010)
- le cuivre sorbé sur des colloïdes de taille infra-micrométrique, de nature chimique variée,
- le cuivre complexé à des ligands inorganiques comme OH^- , HCO_3^-/CO_3^{2-} , $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, Cl^- , SO_4^{2-} , S^{2-} (McBride, 1981)
- le cuivre sous forme ionique libre : $Cu(H_2O)_6^{2+}$.

La liaison à des ligands inorganiques est moins stable que celle à des ligands organiques. De part leur forte affinité avec le cuivre, les complexes organiques dominent donc la spéciation du cuivre dans la solution du sol (Sauvé et al., 1997 ; Ma et al., 2006). Ainsi entre 80 et 99% du cuivre soluble total est complexé à la matière organique dissoute (Sauvé et al., 1997, Vulkan et al., 2000, Aldrich et al., 2002). Dans la solution du sol, le cuivre est donc le plus souvent complexé à de la matière organique dissoute (Cu-MOD) mais on le trouve également sous sa forme libre Cu^{2+} .

Le cuivre sous forme ionique Cu^{2+} est très fortement minoritaire : L'activité de Cu^{2+} libre dans la solution du sol se situe généralement autour de 1 pM dans les sols neutres non contaminés, de 1 à 10 μ M dans les sols acides contaminés, mais jusqu'à 100 μ M dans les cas des sites miniers très contaminés (Sauvé et al., 1997, Vulkan et al., 2000). La spéciation du cuivre et donc sa présence sous la forme Cu^{2+} est pH dépendant (figure 4).

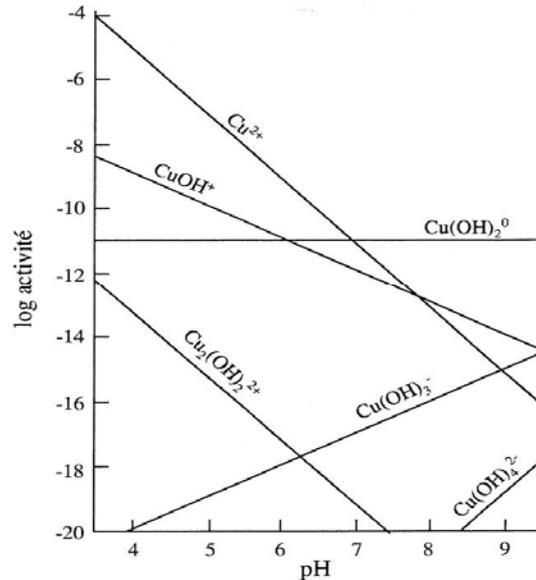


Figure 4: Spéciation du cuivre en équilibre avec le cuivre du sol en fonction du pH (Lindsay, 1979)

A pH inférieur à 7, le cuivre en solution se trouve majoritairement sous la forme Cu^{2+} (Lindsay, 1979 ; McBride, 1989) CuOH^+ et $\text{Cu}(\text{OH})_2^{2+}$ (Kabata Pendias, 2010). Tandis qu'à $\text{pH} > 7$, on trouve majoritairement le cuivre en solution sous la forme $\text{Cu}(\text{OH})_2$ (Lindsay, 1979), $\text{Cu}(\text{OH})_3^-$ et $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$ (Kabata Pendias, 2010).

1.1.4.3 Influence des échanges sol-solution sur la disponibilité du cuivre

Les échanges entre la phase solide du sol et la solution du sol dépendent majoritairement de deux paramètres physicochimiques : le pH et la teneur en matière organique du sol (Sauvé et al., 1997).

Lorsque le pH augmente, l'affinité hydroxydes et des carbonates pour les cations métalliques augmente et le cuivre est alors adsorbé par la phase solide du sol. Or en présence de matières organiques, dès que le pH est supérieur à 6, la solubilité de la matière organique augmente également (figure 5). La teneur en cuivre augmente alors dans la solution du sol à pH élevé (Carrillo-Gonzalez et al., 2006). Dans ce cas, le cuivre étant majoritairement lié à la matière organique dissoute et la forme inorganique $\text{Cu}(\text{OH})_2$ devenant majoritaire pour un pH supérieure à 7, il y a une diminution de Cu^{2+} libre en solution (Bravin, 2008, Sauvé et al., 1997, Lindsay, 1979).

Au contraire, à pH inférieur à 5, les matières organiques dissoutes sont adsorbées sur les surfaces minérales (McBride, 1989 ; Harter et Naidu, 1995) ce qui mobilise le cuivre dans la phase solide du sol (Michaud et al., 2007). Plus le pH diminue, plus le cuivre est adsorbé sur la phase solide du sol (Arias et al., 2005). Contrairement à d'autres cations métalliques, le cuivre est peu labile à pH inférieur à 5 (Bravin, 2008).

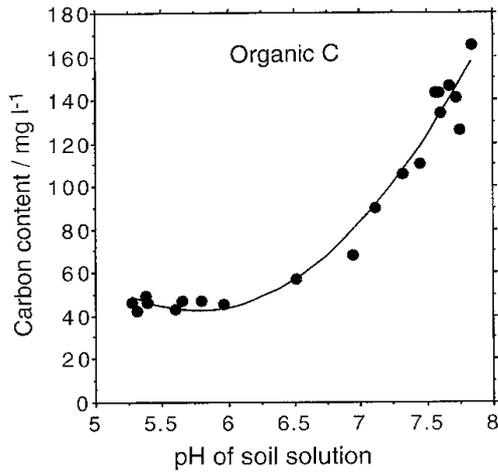


Figure 5 : Evolution de la concentration en carbone organique dissous (COD) en fonction du pH de la solution du sol (Tyler et Olsson, 2001)

1.1.5 Principe de disponibilité et de biodisponibilité

Une définition officielle est donnée par l'ISO : « La biodisponibilité est le degré avec lequel les contaminants chimiques présents dans un sol peuvent être absorbés ou métabolisés par un humain ou un récepteur écologique ou sont disponibles pour une interaction avec des systèmes biologiques » (ISO DIS 11074). Elle peut se décliner selon 3 composantes (figure 6).

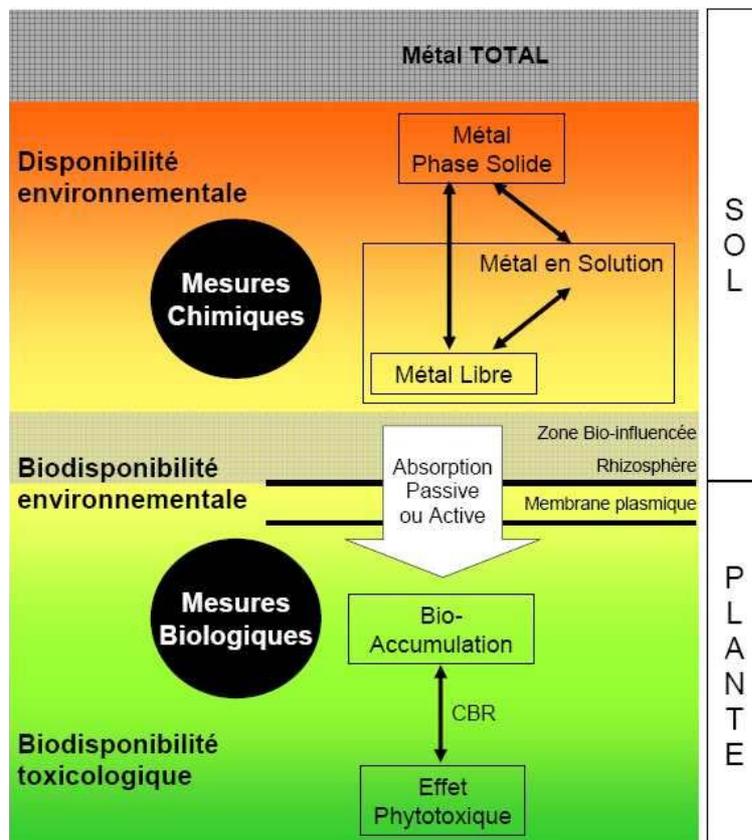


Figure 6: Synthèse des relations entre les trois composantes de la biodisponibilité des métaux pour les plantes (avec CBR = Critical Body Residue) (Bravin, 2008 d'après Lanno et al., 2004)

La disponibilité environnementale d'un métal est une fraction de la teneur totale du métal dans le sol capable de passer d'un compartiment à l'autre du sol (Harmsen et al., 2005, Hough et al., 2005) en fonction de processus physico-chimiques de désorption (Bravin, 2008). L'étape ultime de ce processus étant le passage du métal dans la solution du sol.

La biodisponibilité environnementale est la fraction disponible du métal, prélevée par un organisme vivant grâce à des processus physiologiques d'absorption actifs ou passifs (Thornton, 1999). Elle dépend à la fois de l'espèce végétale concernée, de son génotype (Chaignon, 2001 ; Michaud et al., 2007), de son âge, de l'organe cible, mais aussi du temps d'exposition au sol contaminé (Harmsen et al., 2005). Le flux moyen de métal est estimé à partir de l'accumulation de métal dans la plante pendant la durée de la phase d'exposition au sol contaminé (Harmsen et al., 2005).

Enfin, la biodisponibilité toxicologique prend compte à la fois l'accumulation du métal dans la plante et l'induction de ses effets phytotoxiques mesurables sur la plante (Bravin, 2008). Ces derniers apparaissent au delà d'un seuil d'accumulation du métal dans l'organisme, la charge critique du corps (CBR) (Bravin, 2008).

Dans ce mémoire, le terme de disponibilité sera utilisé pour le cuivre présent dans le sol sous une forme potentiellement absorbable par un organisme vivant. Le terme de biodisponibilité sera employé pour désigner sa biodisponibilité environnementale. Le cuivre doit d'abord être disponible pour être biodisponible.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de mesure permettant d'évaluer directement la teneur en cuivre disponible dans le sol compte tenu de la diversité des sols et de la complexité des processus physico-chimiques en jeu. Il est seulement possible d'évaluer le teneur en cuivre sous ses différentes formes (totale, complexée, en solution, libre...). Or celles-ci évoluent dans le temps et dans l'espace.

1.1.6 Impact des pratiques viticoles sur la disponibilité du cuivre

Dans des sols viticoles, tant que les traitements cupriques se poursuivent, l'accumulation du cuivre dans les horizons superficiels s'amplifie. Le cuivre d'origine anthropique, dont l'origine a pu être déterminée dans le sol grâce à l'isotope Cu_{65} (El Azzi et al., 2013), est plus disponible pour les plantes que le cuivre d'origine lithogène (Grupe et Kuntze, 1988). La conversion de cuivre de sa forme active à sa forme résiduelle nécessite des pas de temps importants de plusieurs dizaines d'années. De fait, il peut donc rester disponible et mobile pendant une longue période (Pietrzak et McPhail, 2004). La proportion de cuivre disponible varie dans le sol : il représente 8 à 12% de la teneur totale en cuivre du sol dans les horizons de surface des sols non contaminés (Pietrzak et McPhail, 2004), de 23 à 60% dans les sols contaminés (Michaud et al., 2007, Duplay et al., 2014, Pietrzak et Mcphail, 2004).

La répartition de la teneur totale et de la fraction disponible du cuivre évoluent au cours du temps, notamment en fonction de l'histoire de la parcelle. Ainsi, dans les sols de parcelles récemment cultivées en vigne, la concentration totale de cuivre diminue plus rapidement avec la profondeur que dans le sol de vieilles vignes. Pour les parcelles récemment cultivées en vigne et non labourées, ce sont surtout les 10 premiers centimètres qui sont concernés par l'accumulation du cuivre tandis que pour les anciennes parcelles viticoles la contamination concerne les 25 premiers centimètres du sol (Pietrzak et Mcphail, 2004). Une dizaine

d'années après l'arrêt des traitements cupriques, la distribution du cuivre entre les fractions évolue (tableau 4).

Tableau 4: Répartition des fractions de cuivre en fonction de la profondeur et de l'historique parcellaire (Pietrzak et McPhail, 2004)

Horizons	Sols non contaminés		Sols de jeunes vignes traitées		Sols de vieilles vignes, arrêt traitement depuis 10 ans	
	0-10 cm	H > 20 cm	0-10 cm	H > 20 cm	0-10 cm	H > 20 cm
Cu disponible (en solution + échangeable+ sorbé)	5-12%	8-12%	50-70%	25-30%	60%	40-45%
Cu lié à MO	15-17%	3-4 %	20-25%	5-10%	20-25%	10-20%
Cu mobilisable (lié aux carbonates ou réductible)	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%	<10%
Cu immobilisé (résiduel ou lié aux oxydes de Fe)	60%	80-100%	2-5%	55-60%	5-15%	30-35%

Certaines pratiques agricoles comme l'apport d'amendements organiques ou le chaulage peuvent modifier momentanément la disponibilité du cuivre dans le sol tandis que le travail du sol peut modifier la répartition du cuivre entre les différents horizons.

La qualité des matières organiques comme le compost est très variable et peut donc avoir un impact non négligeable sur la contamination des sols (Farrell et Jones, 2010) et la disponibilité du cuivre (Ingelmo et al., 2012). L'apport d'amendements contaminés en cuivre tels que le lisier de porc, les boues de stations d'épuration ou le compost de sarments de vigne, peut augmenter la teneur en cuivre total du sol. L'apport de matières organiques dans le sol sous forme d'amendements faiblement contaminés en cuivre permet de réduire la disponibilité du cuivre. En vigne, les effets de l'apport d'amendements organiques non contaminé perdurent 10 ans après, en maintenant le cuivre stocké dans les 10 premiers cm du sol (Baize et Tercé, 2002). Toutefois, dans les sols carbonatés, l'apport de compost augmente la fraction de cuivre échangeable (Flores-Velez, 1996). Par ailleurs, l'apport d'engrais azotés sous forme de nitrate d'ammonium, acidifie le sol, augmente la disponibilité du cuivre et favorise sa biodisponibilité pour la culture (Xie et al., 2009).

Dans des sols très acides, le chaulage pour remonter le pH permet de diminuer la disponibilité du cuivre (Flores-Velez, 1996). Mais sur des sols de pH >6, le chaulage pourrait avoir l'effet inverse en favorisant la solubilité des matières organiques.

Certaines pratiques modifient davantage la répartition du cuivre dans les horizons que sa disponibilité. Ainsi, la teneur en cuivre est jusqu'à quatre fois plus élevée sous le rang que dans l'inter-rang pour l'horizon de surface (Pietrzak et Mcphail, 2004, Mirlean et al., 2007, Fernandez-Calvino et al., 2012) ce qui atteste de l'évolution des pulvérisateurs de précision. Toutefois le travail du sol comme le buttage pourraient entraîner une homogénéisation de l'horizon de surface.

Le passage fréquent d'engins agricoles dans les parcelles entraîne un tassement du sol préjudiciable à la vie biologique du sol. De fait, la dégradation de la matière organique est ralentie (Baize et Tercé, 2002). Or la matière organique est le complexant le plus efficace pour limiter la disponibilité du cuivre dans le sol.

Les labours parfois pratiqués lors de l'arrachage ou avant la replantation de la vigne, engendrent une redistribution et une accumulation de Cu dans les horizons plus profonds (Brun et al., 1998 ; Mirlean et al., 2007, Bravin, 2008) puisque cette pratique permet d'inverser les horizons des 50 premiers centimètres du sol (figure 7).

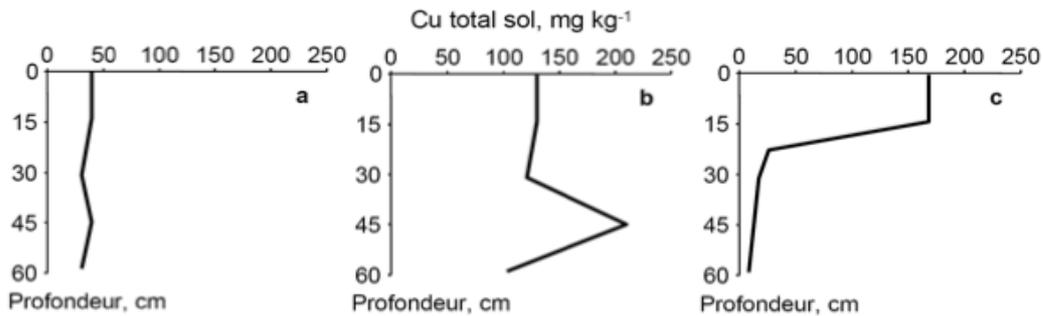


Figure 7: Profils du cuivre total en fonction de la profondeur pour trois sols viticoles (a) non contaminé, (b) contaminé puis labouré, (c) contaminé sans labour (Brun et al., 1998).

Cette configuration est d'une part préjudiciable au bon développement des racines de la vigne et d'autre part, entraîne un risque plus important de lixiviation du cuivre depuis cet horizon lorsque la minéralisation de la matière organique y sera achevée puisque la matière organique est surtout réapprovisionnée en surface.

La plupart des études sur la disponibilité en cuivre sont réalisées en conditions artificielles et ne prennent en compte que l'élément sol. Or les organismes biologiques présents dans le sol (microorganismes, macroorganismes, racines) peuvent en modifier les propriétés (pH, matière organique). Ainsi, les propriétés chimiques à proximité de la rhizosphère peuvent être différentes des propriétés chimiques du sol où elle se trouve. Enfin, le cuivre disponible peut également avoir un effet sur les organismes biologiques du sol.

1.1.7 Effet du cuivre sur les organismes du sol

Les organismes du sol se composent de la macrofaune, la mésofaune, la microfaune, les communautés bactériennes et fongiques. Une diminution de la biomasse microbienne du sol a souvent été observée dans des sols viticoles ou arboricoles ayant reçu des traitements cupriques (Wang et al., 2009) même après cinq ans de traitements seulement. Les invertébrés du sol (nématodes, acariens, collemboles, vers enchytreides, vers de terre, isopodes et gastéropodes) sont potentiellement des indicateurs biologiques de la qualité des sols (Drobne, 1997, Cortet et al., 1999, Lanno et al., 2004, Van Zwieten et al., 2004, Eijsackers et al., 2005, Snyman et al., 2009). Il est préférable d'utiliser plusieurs bio-indicateurs plutôt que de se focaliser sur un seul : les nématodes, les protozoaires, les gastéropodes et les isopodes sont de bons bioaccumulateurs de métaux (Cortet et al., 1999). Les espèces de lombrics qu'elles soient sensibles ou résistantes, varient également en fonction de la profondeur. Les lombrics peuvent donc apporter des renseignements sur plusieurs horizons. L'étude des microarthropodes comme les acariens et les collemboles qui décomposent la litière, permet de comprendre l'impact sur le fonctionnement du sol (Bengtsson et al., 1985, Cortet et al., 1999).

Les effets sur les collemboles ont été étudiés en les nourrissant avec des champignons ayant été cultivés en milieu contaminé au cuivre : leur survie et leur taux de reproduction sont plus faibles lorsqu'ils sont élevés sur champignons contaminés. Par ailleurs le développement des larves est ralenti pour la génération F2 et leur taux de survie est encore plus faible que pour les générations précédentes lorsqu'une contamination élevée en cuivre persiste. Il y a donc des conséquences fortes pour la survie de cette espèce à long terme dans des sols fortement contaminés. Les mêmes conséquences ont été observées in situ, sur un terrain situé à proximité d'usines de cuivre (Bengtsson et al., 1985).

Chez les lombrics, on distingue 3 groupes dont l'étude permet d'avoir une bonne indication sur les effets du cuivre dans le sol : les endogés qui se nourrissent de la matière organique et qui sont sensibles au cuivre puisqu'ils disparaissent lorsque la teneur en cuivre totale du sol atteint 175 mg Cu/kg ; les épigés qui peuplent les litières et qui sont plus sensibles aux pratiques culturales comme le labour mais nettement moins affectés par le cuivre ; enfin, les anéciques qui se nourrissent dans la litière et sont très tolérants au cuivre (Paoletti et al., 1998). Dans les sols viticoles, les communautés de lombrics sont généralement dominées par ces derniers (Cluzeau, 1987). L'excès de cuivre dans le sol entraîne à la fois une diminution de la biomasse de 34% et une baisse de la diversité des lombrics de 64% dès 50 mg Cu/kg de sol en teneur totale (Paoletti et al., 1998). Cela entraîne une diminution de la fertilité des sols, de l'aération du sol et de sa capacité de rétention d'eau.

Des effets délétères sont également avérés sur la communauté bactérienne du sol comme une baisse de la biomasse microbienne (Courde, 2000) et une modification de sa biodiversité puisqu'une teneur totale de 100 mg Cu/kg de sol, entraîne une sélection des populations bactériennes tolérantes au cuivre (Diaz-Ravina et al., 2007, Lejon et al., 2008, Viti et al., 2008, Andreatza et al., 2010). En réalité, l'augmentation de la mortalité chez les bactéries est corrélée à l'augmentation des Cu^{2+} présents dans leur environnement (Vulkan et al., 2000). Ainsi dans les sols de vieilles vignes, la population bactérienne hétérotrophe cultivable reste importante mais avec une diversité génotypique plus faible. Or, la diversité des organismes du sol est une des clés du fonctionnement de l'agrosystème (Brookes, 1995). Pour autant, une modification de la diversité de la communauté n'entraîne pas forcément de différence fonctionnelle de l'écosystème (Marschner, 2003, Wang et al., 2009) puisque l'activité biologique du sol semble assurée par les microorganismes tolérants (Courde, 2000). A contrario, certaines populations de rhizobium des légumineuses diminuent significativement avec la forte teneur en cuivre du sol (Laguette et al., 2006). Les communautés fongiques du sol sont moins sensibles à la contamination en cuivre du sol que les communautés bactériennes (Ranjard et al., 2006, Wakelin et al., 2014) grâce à leur grande capacité d'immobilisation extracellulaire du cuivre. Plutôt que la disponibilité en cuivre, ce serait davantage la variation du pH ou de la teneur en matières organiques qui influenceraient les modifications des communautés fongiques du sol (Lejon et al., 2008, Fernandez-Calvino et al., 2012, Wakelin et al., 2014). Toutefois, dans les sols contaminés au cuivre, il y a une modification du ratio bactérie : champignon au profit des communautés bactériennes plus tolérantes au cuivre (Wakelin et al., 2014). Il est possible que la pression exercée sur la population bactérienne ait entraînée une sélection de populations tolérantes au cuivre (donc plus compétitives en milieu contaminé) tandis que la détoxification par la population fongique a induit un coût énergétique non négligeable sans entraîner le bénéfice de la sélection de la population.

Des modifications climatiques stressantes, comme des étés chauds et secs, (Ranjard et al., 2008, Owojori et Reinecke, 2010) ou certaines pratiques culturales comme le labour (Mackie et al., 2013) pourraient augmenter l'impact du cuivre sur le fonctionnement du sol par la perturbation des communautés telluriques.

Les effets d'une forte teneur en cuivre sur les communautés du sol sont donc très variables mais, la diversité de ses organismes semble suffisamment grande pour que l'activité biologique du sol soit maintenue. Or il existe de nombreuses interactions entre le système racinaire d'une plante et les microorganismes du sol (Becker et al., 2001). Une perturbation du bon fonctionnement biologique du sol pourrait donc avoir un impact sur les cultures.

1.2 Le cuivre dans la plante

Le cuivre étant un oligo-élément essentiel pour les plantes, c'est pourquoi des mécanismes d'absorption puis de transfert vers les organes existent car une déficience en cuivre est préjudiciable à la croissance des plantes. Mais à forte dose, le cuivre devient phytotoxique (Wheeler et Power, 1995). Le seuil de tolérance est variable selon les espèces végétales et les organes cibles.

1.2.1 Le cuivre, un oligo-élément pour les plantes

Le cuivre est un des 7 oligo-éléments (Zn, Mn, Fe, B, Mo, Cl), indispensable à faible dose aux plantes. Au niveau du métabolisme de la plante, suivant son état d'oxydation, le cuivre joue un rôle important dans de multiples systèmes enzymatiques tels que la photosynthèse, la respiration, l'alimentation, la fertilité ou la détoxification.

Le cuivre est un des constituants de protéines impliquées dans la photosynthèse comme les plastocyanines des chloroplastes. Son rôle de cofacteur dans le transport d'électrons du photosystème II est également primordial (Marschner, 1995). Il intervient dans la constitution de protéines engagées dans le processus de la respiration mitochondriale (cytochrome oxydase), des réactions d'oxydation de l'acide ascorbique (ascorbate oxydase) et de la détoxification de radicaux superoxydes (superoxyde dismutase) mais aussi de la synthèse de lignine de la paroi cellulaire (peroxydases et phénols oxydases), (Loué, 1993, Marschner, 1995, Clemens, 2001). Le cuivre intervient dans le métabolisme et la distribution des hydrates de carbone, des lipides, de la réduction et de la fixation de l'azote (Marschner, 1995). Il intervient dans le contrôle hydrique en influençant la perméabilité à l'eau des vaisseaux xylèmes (Kabata Pendias, 2010). Il est intéressant de noter que le cuivre joue également un rôle dans le processus de coloration en jaune des fleurs (Nakayama et al., 2000) et la production de graines.

Des mesures réalisées sur plusieurs dizaines d'espèces végétales, ont permis de déterminer une concentration optimale comprise entre 2 à 30 mg Cu/kg MS (matière sèche) dans les parties aériennes pour la croissance des plantes (figure 8). Cette fourchette doit ensuite être affinée pour chaque espèce, voire pour chaque variété, en fonction de ses capacités homéostatiques. Une carence ou un excès de cuivre sont néfastes au bon développement de la plante.

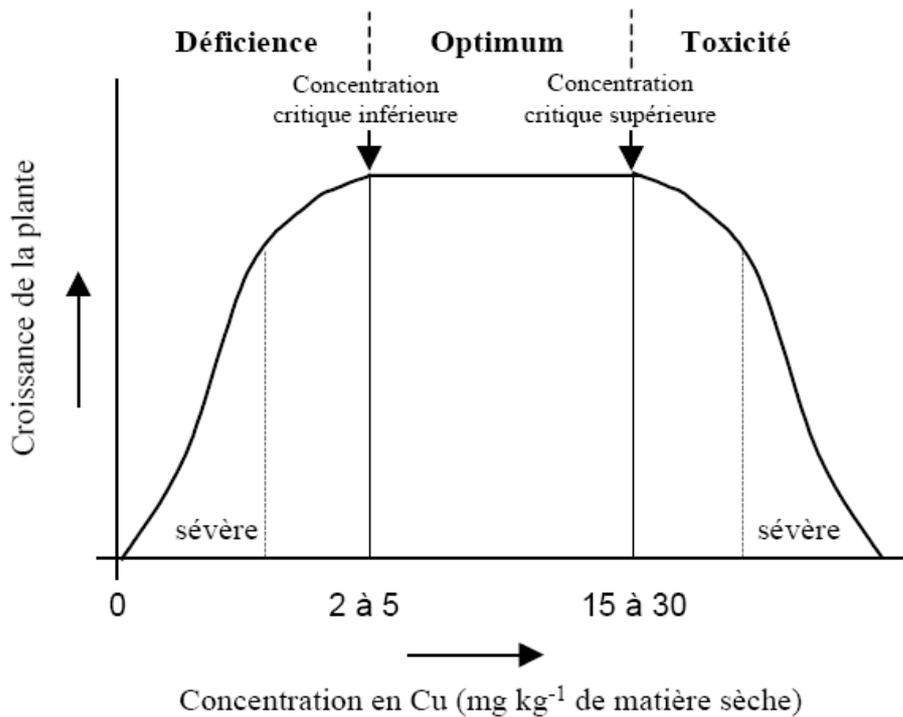


Figure 8: Croissance de la plante en fonction de la concentration en cuivre dans la matière sèche des parties aériennes de la plante (Reuter et Robinson, 1997)

Les symptômes visuels de déficiencé en cuivre sont difficiles à détecter car ils ne sont pas typiques et peuvent être confondus avec d'autres (Loué, 1993). Les jeunes organes aériens plus sensibles, sont les premiers à développer des symptômes de déficiencé en cuivre (Kabata Pendias, 2010). Les principaux symptômes macroscopiques sont une altération du développement des pollens (Jewell, 1988), des troubles de l'épiaison sur céréales, une décoloration blanches du bout des jeunes feuilles (Loué, 1993), un défaut de turgescence des feuilles lorsque les vaisseaux du xylème sont insuffisamment lignifiés (Kabata Pendias, 2010). En outre, en cas de carence en cuivre, on observe une augmentation de l'absorption de manganèse pouvant entraîner une toxicité à ce métal. Enfin dans les cas de déficiencés en cuivre les plus graves, la mort des jeunes pousses survient tandis que les arbres se rabougrissent (Loué, 1993). Le diagnostic d'une déficiencé en cuivre est confirmé lorsque la teneur en cuivre de jeunes feuilles est inférieure à 4 mg/kg (Loué, 1993).

En France, la vigne ne présente généralement pas de symptômes de déficiencé en cuivre, sauf si elle est nouvellement implantée sur des sols déficients (sols très humiques ou très acides, sols granitiques) et si aucun traitement cuprique fongicide n'a été réalisé. Les cas de toxicité au cuivre sont plus fréquents qu'une carence au cuivre en vigne.

1.2.2 Phytotoxicité cuprique

Symptômes

Un excès de cuivre dans le sol provoque d'abord une rhizotoxicité qui s'exprime par une coloration brune des racines, une diminution de la formation des poils absorbants, une diminution de l'élongation racinaire (Kopittke et Menzies, 2006), un épaississement des

racines (figure 9A) (Marschner, 1995, Panou-Filothéou et Bosabalidis, 2004) et la diminution de la biomasse racinaire (Bravin, 2008) avant d'affecter la croissance des parties aériennes (Marschner, 1995).

Au niveau des parties aériennes, les symptômes observés sont des atteintes du feuillage telles que des déformations, des décolorations jaunes internervaires caractéristiques des chloroses ferriques (Michaud et al., 2007, Davis et Beckett, 1978) induite par un excès de cuivre (figure 9B), des nécroses et une altération de développement de la vigne (Coïc et Coppenet, 1989, Brun et al., 1998). Dans les cas les plus graves cela peut conduire au nanisme (Marcellin, 1974) ou à la mort des souches.

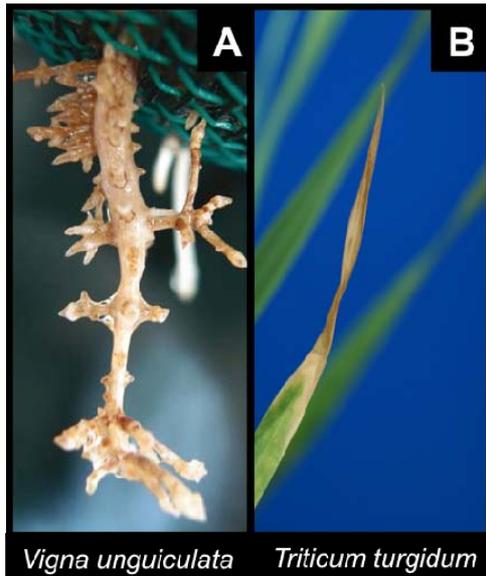


Figure 9: Symptômes de toxicité cuprique sur la morphologie des racines de niébé (A) et sur les feuilles de blé dur avec chlorose et dessèchement des pointes (B) (Kopittke et Menzies, 2006)

Les cas de phytotoxicité en vigne concernent peu les vignes âgées dont le système racinaire peut descendre en dessous des horizons du sol contaminés (Chaignon, 2001). Dans le cas des vignes âgées, ce sont surtout les conséquences indirectes d'un excès de cuivre comme la chlorose ferrique qui sont observées (figure 10A) tandis que les effets directs de la phytotoxicité cuprique touchent les jeunes vignes.

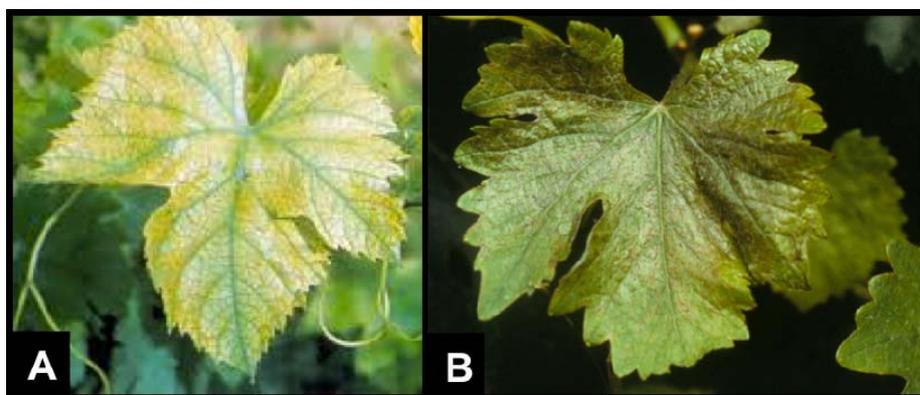


Figure 10: (A) Symptômes de chlorose ferrique sur vigne (vignevin-sudouest.com). (B) Brûlure sur feuille de vigne occasionnée par une mauvaise application d'un traitement cuprique (ephytia, INRA)

Ainsi, la reprise de jeunes plants de vigne est souvent difficile les trois à cinq premières années dans les sols contaminés d'une part parce que les jeunes organes sont plus sensibles à

la toxicité cuprique ; d'autre part car c'est le temps nécessaire pour que leurs racines traversent l'horizon contaminé. Plus le sol est contaminé, plus le temps de reprise des jeunes plants augmente. La toxicité apparaît généralement s'il y a une grande quantité de cuivre biodisponible, une CEC faible et un sol acide. Les symptômes peuvent régresser lorsque les racines atteignent un horizon moins acide (Delas et Juste, 1975) ou moins toxique. Si avant la plantation on apporte un amendement calcaire de manière à remonter le pH à 6, on atténue cette toxicité. Toutefois, le problème peut encore se poser si le sol a été labouré et que l'horizon contenant le plus de cuivre a été enfoui (Flores Velez, 1996).

La contamination des sols impacte également l'enherbement entre les rangs de vigne. Cette pratique qui vise à limiter l'érosion des sols et à augmenter la portance des engins agricoles est rendue difficile par la sensibilité plus importante des graminées couramment utilisées à la toxicité cuprique. La difficulté de l'installation de l'enherbement peut être un bon indicateur du risque de toxicité cuprique sur la parcelle avant l'implantation de jeunes plants de vignes.

Enfin, une application du cuivre inadéquate peut provoquer ponctuellement par contact des brûlures d'aspect doré (figure 10B), des lésions nécrotiques et une déformation ponctuelle des feuilles. Des applications excessives de traitements cupriques avant floraison pourraient avoir un effet pollinicide et provoquer du millerandage sur vigne bien que cela n'ait pas été clairement démontré (Branas, 1984).

Modifications métaboliques et cellulaires

A l'échelle cellulaire, le cuivre provoque l'inhibition de la division (Eleftheriou et Karataglis, 1989), et de l'élongation cellulaire par augmentation de la rigidité des parois du fait du remplacement des ions Ca^{2+} par les Cu^{2+} dans l'apoplasme (Arduini et al., 1994). La ramification racinaire augmente mais les racines ne se développent pas et restent à l'état de renflement au niveau subapical (Kopittke et al., 2007, Bravin, 2008). De plus, l'excès de cuivre, stocké dans les vacuoles des cellules situées sous l'endoderme des racines pour éviter le transfert du cuivre vers les parties aériennes, peut provoquer des ruptures au niveau des racines qui sont alors coupées en deux (Kopittke et al., 2009).

Ces modifications racinaires provoquent une altération de la perméabilité des membranes plasmiques (Kabata Pendias, 2010) ce qui conduit à une perturbation généralisée de l'alimentation de la plante (Panou-Filothéou et Bosabadilis, 2004 ; Sheldom et Menzies, 2005, Kopittke et Menzies, 2006 ; Kopittke et al. 2007b) à partir d'exposition supérieures à 1 μM de Cu^{2+} libre (Bravin, 2008). L'absorption de Fe, Ca, Mg, Mn, Zn diminue (Loué, 1993, Sheldom et Menzies, 2005, Kopittke et Menzies, 2006, Kopittke et al., 2007a, Toselli et al., 2008) tandis que l'efflux de K et P augmente (Lexmond et Van der Vorm, 1981).

Ainsi, la diminution en potassium s'explique par les modifications de la membrane plasmique (Ric de Vos et al., 1989) due à l'exposition au cuivre, ce qui entraîne une diminution de l'activité de l'ATPase (Mas et al., 1994) et donc de la régulation du potassium. La conséquence qui en découle est augmentation de l'efflux de K (Lexmond et Van der Vorm, 1981) et une diminution du flux d'eau dans la plante (Romeu-Moreno et Mas, 1999). La réponse physiologique de la plante à une exposition élevée au cuivre serait donc une restriction en eau et une diminution de la translocation des éléments minéraux (Romeu-Moreno et Mas, 1999) ce qui explique le ralentissement de croissance observé.

La chlorose ferrique induite par un excès de cuivre est un symptôme couramment observé sur les parties aériennes en cas de phytotoxicité cuprique (Kabata-Pendias, 2010). Cela s'explique par l'antagonisme fer-cuivre pour les transporteurs utilisés lors de l'absorption racinaire

(Lexmond et Van der Vorm, 1981) ou lors de la translocation vers les parties aériennes (Toselli et al., 2008, Romeu-Moreno et Moreno, 1999). Par conséquent, la teneur en fer dans la plante décroît (Kopittke et Menzies, 2006), notamment au niveau des chloroplastes, dont le nombre diminue (Panou-Filothéou et al., 2001), ce qui perturbe rapidement la synthèse de la chlorophylle. Les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes décroissent à leur tour (Ouzounidou et al., 1992, Lou et al., 2004, Rouphael et al., 2008), on observe alors une décoloration internervaire caractéristique. Comme le fer joue un rôle dans le photosystème II mais également comme enzyme dans le processus de croissance et de développement de la plante (Ksouri et al., 2005, Bert et al., 2013), la chlorose induit une perturbation de la photosynthèse (Rouphael et al., 2008, Cambrolle et al., 2013), de la conductance stomatique (Rouphael et al., 2008) une diminution de l'assimilation de l'azote (Llorens et al., 2000, Cambrolle et al., 2013), et une perturbation de l'absorption des autres cations. Le ralentissement de la croissance est un symptôme de déficience en fer qui précède les symptômes de chlorose (Gruber et Kosegarten 2002, Diaz et al., 2009).

Pour pallier à la déficience en fer, notamment dans les sols calcaires, les monocotylédones secrètent des phytosidérophores au niveau racinaire qui vont chélater le fer. Le complexe ion-phytosidérophore est alors transporté dans la plante (Römheld et Marschner, 1986). Les dicotylédones modifient leur métabolisme racinaire en secrétant davantage de protons ou d'acides organiques comme les citrates et les malates afin d'augmenter la disponibilité du fer sous sa forme soluble assimilable Fe^{2+} (Ollat et al., 2003). Or, ces deux processus augmentent aussi la capacité d'acquisition d'autres éléments métalliques comme le cadmium, le zinc, le cuivre ou le nickel (Michaud et al., 2007). En cas d'excès de cuivre dans les sols, la complexation du cuivre avec les phytosidérophores inhibe alors l'acquisition du fer (Michaud et al., 2007) ce qui paradoxalement entretient l'effet chlorosant. Chez la vigne certains cépages comme RGM et 101.14 se montrent plus sensibles que d'autres comme le Cabernet Sauvignon à une déficience en fer (Ollat et al., 2003).

Ce ne sont pas seulement l'absorption et le transport des nutriments de la plante qui sont affectés par un excès de cuivre, mais l'ensemble du métabolisme primaire qui est perturbé (Rouphael et al., 2008). L'immobilisation du cuivre au niveau des parois cellulaires et des vacuoles bloque la diffusion des complexes Cu-protéines (Kabata Pendias, 2010) impliqués dans de nombreux processus enzymatiques. La toxicité du cuivre se traduit ainsi par la fixation du métal sur le groupement thiol des protéines ce qui provoque l'inhibition de leur activité, modifie leur structure, ou provoque une déficience en un autre élément avec lequel le cuivre en excès entre en compétition (Hall, 2002). Il en résulte une diminution de la concentration en protéines, en sucres solubles, en amidon et en lipides (Lanaras et al., 1993, Lidon et al., 1993, Quartacci et al., 1999) tandis que la peroxydation des acides gras insaturés augmente (Luna et al., 1994, Romeu-Moreno et Mas, 1999). Cette peroxydation est la conséquence du stress oxydant induit par l'excès de cuivre.

L'excès de cuivre provoque un stress oxydant qui se traduit par une augmentation de la concentration en formes actives de l'oxygène H_2O_2 ou radicaux libres et une diminution des défenses antioxydatives (Luna et al., 1994, Yruela et al., 1996, Hall, 2002, Yruela, 2005, Puig et al. 2007). Normalement, on ne retrouve pas ces ions métalliques libres dans le milieu intracellulaire car ils sont chélatés à des ligands organiques, sauf lorsque l'influx d'ions est trop important (Clemens, 2001). Le stress oxydant agit sur la peroxydation des lipides, entraîne la destruction des membranes plasmiques, la détérioration des thylakoides et des chloroplastes, l'altération des photosystèmes voir l'inhibition de la photosynthèse (Yruela et al., 1996, Yruela, 2005, Quartacci et al., 1999, Ciscato et al., 1997). Il peut également entraîner une génotoxicité par altération des bases azotées de l'ADN (Briat et Lebrun, 1999).

La mesure de la teneur en cuivre dans la plante (biodisponibilité environnementale et bioaccumulation) peut être un indicateur de toxicité cuprique.

1.2.3 Teneurs en cuivre dans la plante

De nombreuses études ont été réalisées en hydroponie et *in situ* afin de déterminer les seuils de biodisponibilité environnementale et toxicologique. Or, ces seuils sont extrêmement variables d'une espèce végétale à l'autre et en fonction des conditions expérimentales. La mesure de la teneur en cuivre dans la plante permet de connaître à la fois ses capacités d'absorption, de stockage et d'homéostasie, c'est pourquoi elle est souvent utilisée en complément de l'observation des symptômes.

La plupart des plantes ont des teneurs en cuivre dans les racines plus élevées que dans les parties aériennes car elles stockent préférentiellement le cuivre dans les racines afin de limiter sa translocation vers les parties aériennes du fait du stress oxydatif qu'il peut y engendrer. Les valeurs seuils de toxicité pour les racines sont donc différentes des valeurs seuils de toxicité pour les parties aériennes.

Pour les racines, la concentration moyenne se situe entre 15 et 25 mg Cu/ kg mais peut atteindre de 40 à 24 700 mg Cu/kg lors de fortes contaminations (Brun et al., 2001, Chaignon et al., 2003, Michaud et al., 2007) en fonction des espèces végétales. L'accumulation du cuivre se situe surtout dans les racines fines de diamètre inférieur à 2 mm et pas dans les racines pivotantes (Brun et al., 1998, Chopin et al., 2008). Les grosses racines servent de zone de stockage temporaire tandis que les racines fines sont plus réactives du fait d'une respiration et d'une activité enzymatique plus élevées (Morinaga et al., 2003). Par conséquent, ces dernières assimilent et absorbent davantage les éléments traces (Brun et al., 2001) et sont les premières touchées en cas de phytotoxicité.

Les concentrations moyennes de cuivre dans les feuilles se situent autour de 5 mg Cu/kg et peuvent atteindre de 10 à 49 mg Cu/kg en cas de contamination cuprique (Brun et al., 1998, Brun et al., 2001, Chaignon et al., 2003, Michaud et al., 2007). Normalement, la distribution du cuivre dans les feuilles est relativement uniforme (Scheffer et al., 1979). Mais en cas de contamination cuprique, les concentrations les plus élevées dans les parties aériennes sont observées chez les jeunes organes lors des phases de croissance intensive (Kabata Pendias, 2010) et dans les graines des céréales (Loneragan, 1981).

Teneurs en cuivre dans la vigne

Comme pour la plupart des plantes, la concentration en cuivre des racines de vigne est plus élevée que la concentration en cuivre des parties aériennes (tableau 5).

Les concentrations en cuivre des racines et des feuilles augmentent en cas de contamination élevée au cuivre, surtout dans les racines qui est le compartiment de stockage (Romeu-Moreno et Mas, 1999). De fait, plusieurs auteurs estiment que la teneur en cuivre des racines serait plus pertinente pour évaluer le cuivre biodisponible dans le sol (Toselli et al., 2008) que les parties aériennes. Ce pourrait être un bon indicateur du risque de toxicité, si les racines étaient plus facilement accessibles.

Tableau 5 : Teneurs en cuivre mesurées dans les différents organes de la vigne en fonction du cépage et du niveau de contamination du substrat (APT=après traitement cuprique aérien).

Cépage	Cu total du substrat	Cu dans les racines (mg/kg)	Cu dans les parties aériennes (mg/kg)	Source
R-110 (<i>V. rupestris</i> x <i>V. berlandieri</i>)	5 mg/kg	89 mg/kg	Feuilles 15,6	Romeu-Moreno et Mas, 1999
Sauvignon (<i>V. vinifera</i>)	5 mg/kg	102 mg/kg	Feuilles 19,4	Romeu-Moreno et Mas, 1999
Cabernet Sauvignon (<i>V. vinifera</i>)	5 mg/kg	77 mg/kg	Feuilles 16,9	Romeu-Moreno et Mas, 1999
Cabernet Sauvignon (<i>V. vinifera</i>)	3,6-672 mg/kg		Feuille 8,45-9,97 Grappe 9,9-13,1	Ko et al., 2007
Chardonnay (<i>V. vinifera</i>)	3,6-672 mg/kg		Feuille 6,9-8,35 Grappe 13,8-14,6	Ko et al., 2007
Pinot (<i>V. vinifera</i>)	227 mg/kg	Racines Ø < 2mm 48 mg/kg Racines Ø > 2 mm 18 mg/kg	Feuille 6,7 Grappe 4,5	Chopin, 2008
Golden Muscat (<i>V. vinifera</i>)	23,5 mg/kg		Feuille APT 412 Grappe APT 40	Lai et al., 2010
Black Queen muscat (<i>V. vinifera</i>)	100 mg/kg		Feuille APT 1601 Grappe APT 86	Lai et al., 2010
<i>V. vinifera</i> sp. <i>Sylvestris</i>	23 mM	1300 mg/kg	Feuille 35-80	Cambrolle et al., 2013
Kyoho (<i>V. vinifera</i> x <i>V. Labrusca</i>)	0-50 µM	25-12000 mg/kg	Tige 5-540 Feuille 7-46	Juang et al., 2012
Cabernet Sauvignon (<i>V. vinifera</i>) greffé sur SO4 (<i>V. riparia</i> x <i>V. berlandieri</i>)	4-62 mg/kg	15 mg/kg	Limbe 8-26 Petiole 12-33 Limbes APT 100-400 Petiole APT 20-80 Baies 3-17	Miotto et al., 2014
Sangovièse (<i>V. vinifera</i>) greffé sur SO4 (<i>V. riparia</i> x <i>V. berlandieri</i>)	0-1000 mg/kg	Racines brunes 258-15713 mg/kg Racines blanches 8-340 mg/kg	Feuilles 2,4-7,9	Toselli et al., 2008
Bolgar (<i>V. vinifera</i>) greffé sur Kober 5BB (<i>V. riparia</i> x <i>V. berlandieri</i>)	72 mg/kg	Racines Ø à 1mm 71 mg/kg Racines Ø > 2 mm 24 mg/kg	Petiole APT 84 Limbe APT 668 Grappe APT 50 Pépins APT 11 Pulpe APT 0,9	Angelova et al., 1999

Pourtant selon Miotto et al., (2014) la teneur en cuivre dans la partie symplastique des racines serait constante quelque soit le stade végétatif de la vigne et quelque soit la teneur totale en cuivre du sol, car ce serait surtout la teneur en cuivre de l'apoplasme qui augmente. En outre, les jeunes racines dans lesquelles le cuivre s'accumule le plus, sont les premiers organes dont la croissance est perturbée lors d'une exposition au cuivre, ce qui réduit la quantité de cuivre dans la plante et ses effets toxiques délétères (Miotto et al., 2014). Enfin, l'exposition au

cuivre des racines diminue avec la profondeur lorsqu'elles atteignent des horizons moins contaminés (Angelova et al., 1999).

Toxicité du cuivre chez la vigne

Pour la vigne, les premiers signes de rhizotoxicité tels que le brunissement des racines, le renflement des extrémités des racines et une baisse du cheveu racinaire sont observables pour une contamination du substrat à 10 μM alors que la diminution de la biomasse des racines n'est significative qu'à partir d'une exposition au cuivre de 25 μM (Juang et al., 2012). De même, la perturbation de la translocation du cuivre apparaît à partir d'une exposition à 10 μM par une augmentation de la concentration dans les tiges tandis que l'augmentation de la concentration dans les feuilles n'est mesurable qu'à partir d'une exposition à 25 μM lorsque les barrières membranaires ne fonctionnent plus correctement (Juang et al., 2012). La concentration en cuivre des tiges est corrélée à l'exposition en cuivre surtout en début de croissance, avant la lignification des tissus, l'augmentation de la biomasse aérienne et la dilution due à la transpiration (Miotto et al., 2014). Ces seuils varient probablement en fonction des espèces de *Vitis* et des cépages, mais les conditions expérimentales sont rarement les mêmes d'une étude à l'autre, ce qui rend difficile les comparaisons. A noter, toutefois, que la vigne sauvage européenne (*V. vinifera sp. sylvestris*), espèce protégée, est plus tolérante au cuivre que les cépages cultivés de *V. vinifera*, grâce à la grande capacité de ses racines pour stocker le cuivre, ce qui évite le transfert vers les tissus photosynthétiques plus fragiles (Cambrolle et al., 2013).

L'influence de l'âge de la feuille sur sa concentration en cuivre est en débat. Ainsi, certains indiquent que la différence de concentration en cuivre entre les jeunes feuilles et les vieilles n'est pas significative (Ko et al 2007), d'autres qu'elle augmente avec l'âge de la plante (Li, 1994), diminue après la véraison (Angelova et al., 1999) ou diminue avec l'avancée en stade végétatif à cause de la croissance rapide et de l'activité métabolique (Miotto et al., 2014). Ces divergences pourraient être dues à l'autre limite importante pour comparer les études *in situ* : l'application continue de traitements cupriques pendant l'expérimentation qui fait considérablement augmenter les concentrations en cuivre des parties aériennes après traitement (APT) (tableau 5). De fait, ces teneurs restent élevées même si les organes ont été lavés (Li et al., 1994, Angelova et al., 1999, Lai et al., 2010) à cause du cuivre adsorbé par l'apoplasme des feuilles, des rafles et la peau des baies. Toutefois, comme l'augmentation de la concentration dans le pétiole est nettement moindre que dans le limbe des feuilles ou la pulpe des baies, le cuivre d'origine fongicide appliqué sur les feuilles n'est sans doute pas redistribué vers les autres tissus (Miotto et al., 2014) à la différence de celui absorbé au niveau racinaire. Cela pose malgré tout risque sanitaire pour les populations qui consomment les feuilles (Bagdatlioglu et al., 2010). Le risque est moindre pour les baies car le cuivre s'accumule surtout dans les rafles et le rachis qui ne sont pas consommés (Provenzano et al., 2010). Mais, avec la mécanisation des vendanges et le pressage plus seulement des baies mais des grappes entières, les teneurs en cuivre dans les jus obtenus pourraient augmenter.

Or, les fermentations nécessaires à l'élaboration du vin ne semblent pas affectées bien qu'elles fassent appel à des microorganismes vivants. Toutefois, il semble que la qualité organoleptique des vins blancs puisse être modifiée : « Une seule application cuprique entre la fermeture de la grappe et la véraison, suffit à entraîner une diminution de la teneur en 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one dans les vins de Sauvignon, ainsi que de la perception de l'arôme variétal à la dégustation. De plus, les traitements cupriques des vignes de Sauvignon peuvent entraîner un retard dans la maturité en sucres des raisins. » (Hatzidimitriou et al., 1997).

La vigne présente les mêmes perturbations de la translocation du fer et du métabolisme (lipides, sucres solubles) que les autres plantes décrites précédemment (Romeu-Moreno et Mas, 1999). En ce qui concerne les troubles de l'alimentation de la vigne, les avis divergent : l'assimilation de N est détériorée pour Llorens et al. (2000) et pour Cambrolle et al. (2013) mais pas pour Miotto et al. (2014) qui ne mesure pas non plus de diminution de concentrations de P, Mg Ca dans les feuilles contrairement à Toselli et al. (2008) et Cambrolle et al. (2013). Selon Moreno-Romeu et Mas (1999), une réduction de 60% du flux de sève en cas d'exposition au cuivre pourrait expliquer en partie la diminution de la translocation de Fe, Zn, Cu, Mn, Ca, K et Mg. Enfin, la concentration en S augmente dans la vigne du fait de l'augmentation de composés riches en soufre comme les glucosinolates, les métallothionéines et les phytochélatines qui facilitent la tolérance au cuivre (Cambrolle et al., 2013). Là encore, les différences constatées entre ces auteurs pourraient résulter de la variabilité entre espèces de *Vitis*, entre cépages et de l'influence du greffage.

Ces perturbations ne résultent que de la contamination cuprique suite à une absorption racinaire, le traitement cuprique aérien par contact n'a pas les mêmes effets. Ainsi, on observe une augmentation de lipides peroxydés seulement pour les vignes poussant dans des sols contaminés en cuivre au point que la concentration en cuivre dans les feuilles augmente ; tandis qu'il n'y a pas de modifications des lipides peroxydés entraînées par l'application directe de cuivre sur les feuilles, même si la concentration en cuivre des limbes augmente. Le métabolisme cellulaire n'est donc perturbé que par une contamination cuprique du sol (Miotto et al., 2014).

1.2.4 Influence de l'activité racinaire sur la disponibilité du cuivre dans la rhizosphère

Il a déjà été démontré précédemment comment les facteurs édaphiques pouvaient influencer la disponibilité du cuivre dans les sols. Or, la plante elle-même par son activité racinaire ou grâce aux mycorhizes (Ronn et al., 2002) peut modifier les propriétés du sol au niveau de la rhizosphère comme le pH, le potentiel redox, la composition chimique de la solution du sol (concentrations en anions et cations majeurs, teneur en carbone organique dissous) et ainsi influencer la biodisponibilité des éléments traces métalliques dont le cuivre.

La respiration des racines et des microorganismes de la rhizosphère provoque un influx d'O₂ et un efflux de CO₂ qui peut modifier la concentration en ion bicarbonate (HCO₃⁻). La présence de HCO₃⁻ permet de diminuer l'activité de la Fe III-réductase et de favoriser la mobilisation des éléments traces oxydables. Plus il y a d'oxydations plus le cuivre est mobilisable (Chopin et al. 2008). En milieu alcalin, la dissolution du CO₂ dans l'eau entraîne la formation d'acide carboxylique qui participe à une acidification modérée de la rhizosphère (Hinsinger et al., 2003).

La racine secrète des composés organiques qui enrichissent le compartiment « matières organiques dissoutes » dans la rhizosphère (Cattani et al., 2006, Bravin, 2008). Ces exsudats racinaires peuvent modifier la disponibilité des métaux pour répondre à une carence ou un excès d'un élément (Jones, 1998, Kochian et al., 2004, Ksouri et al., 2007). L'action des ligands est limitée car ils sont vite adsorbés par la phase solide ou biodégradés par les microorganismes du sol en tant que source de carbone (Jones, 1998). Pour maintenir l'électroneutralité cellulaire, la libération de ces exsudats s'accompagne de l'excrétion de protons (H⁺) et d'ions hydroxyl (OH⁻) ou de bicarbonates ce qui entraîne des modifications importantes de pH dans la rhizosphère. Les modifications de pH sont également contrôlées

par l'absorption des cations (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ et NH_4^+) et anions (Cl^- , H_2PO_4^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) majoritaires (Haynes, 1990, Kinraide et al., 2004).

L'augmentation du pH de la rhizosphère par l'activité racinaire en milieu acide permet de diminuer la toxicité aluminique et la biodisponibilité du cuivre ou de pallier à une déficience en phosphore ou en fer (Marschner, 1995, Chaignon et al., 2002, Kochian et al., 2004, Cornu et al., 2007, Michaud et al., 2007, Bravin, 2008). En effet, lorsque les exsudats racinaires d'anions organiques augmentent, cela entraîne une augmentation de la compétition entre H^+ et Cu^{2+} pour les matières organiques dissoutes restantes, d'où une augmentation de l'activité de Cu^{2+} en solution (Bravin, 2008). L'ion libre Cu^{2+} est alors l'espèce majoritaire de cuivre après les formes organiques pour pH inférieur à 7 (Lindsay, 1979 ; McBride, 1989). Comme la compétition entre les protons et Cu^{2+} augmente aussi pour les sites d'adsorption apoplasmique racinaire, l'absorption racinaire du cuivre est plus faible (Michaud et al., 2007) et sa biodisponibilité diminue. A noter que l'exsudation d'anions organiques comme les citrates, en réponse à une toxicité aluminique, se localise essentiellement au niveau de la zone apicale (Ryan et al., 2001) et 5 cm autour (Pineros et al., 2002)

A l'inverse, la diminution du pH par la rhizosphère en milieu neutre ou alcalin par sécrétion d'ions H^+ ou d'acides organiques comme l'acide citrique (Ksouri et al., 2007), qui vise à augmenter la disponibilité du fer, provoque le plus souvent également une augmentation de la biodisponibilité du cuivre lié à la matière organique dissoute (Bravin, 2008).

1.2.5 Mécanismes d'absorption et de translocation du cuivre dans la plante

Il existe deux voies d'absorption du cuivre au niveau racinaire : la voie apoplasmique et la voie symplasmique. Le cuivre s'accumule surtout dans les racines à cause de sa forte affinité pour l'apoplasme racinaire (Marschner, 1995) ce qui explique en grande partie les teneurs élevées des racines en cuivre. Ainsi de 10 à 84 % du cuivre total dans les racines est du cuivre apoplasmique (Iwasaki et al., 1990, Brun et al., 2001, Michaud et al., 2007).

1.2.5.1 L'apoplasme, voie principale d'adsorption de Cu^{2+}

La composition de l'apoplasme et la capacité d'échange cationique racinaire (CECR) varient suivant l'espèce, la variété et l'âge du végétal (Marschner, 1995). Plus la CECR est élevée, plus la concentration en cuivre adsorbée dans l'apoplasme sera importante (Iwasaki et al., 1990). Le cuivre se fixe préférentiellement sur la pectine de la paroi cellulaire lorsque le cuivre est en excès dans le milieu (Konno et al., 2005). L'apoplasme racinaire possède des groupes fonctionnels, le plus souvent carboxyliques, chargés négativement à pH neutre ou alcalin, qui peuvent fortement se lier aux ions Cu^{2+} (Mengel et Kirkby, 2001, Iwasaki et al., 1990). L'adsorption du cuivre sur les constituants de la paroi cellulaire augmente avec le pH (Linehan, 1984) tandis que la complexation du cuivre avec les ligands organiques comme l'acide malique et surtout l'acide citrique diminue son adsorption apoplasmique (Vulkan et al., 2004).

L'adsorption apoplasmique du cuivre sur les parois cellulaires pourrait être mobilisée lors de carence en cuivre et être une étape préliminaire à l'absorption du cuivre (Graham, 1981, Von Wiren et al., 1995). Toutefois, un excès de Cu^{2+} lié à la paroi cellulaire peut avoir une action pro-oxydante et inhiber la croissance cellulaire (Fry et al., 2002 cité par Martins et al., 2012).

1.2.5.2 Absorption du cuivre Cu^+ par la voie symplasmique

L'absorption des métaux correspond à leur transport à travers la membrane plasmique (figure 11). Pour le cuivre, l'absorption s'effectue majoritairement sous la forme ionique libre Cu^+ mais la forme liée aux ligands organiques pourrait être absorbée sans dissociation du

complexe formé (Xuan et al., 2006). Les mécanismes d'absorption du cuivre sont encore mal connus, bien qu'ils aient été étudiés chez *Arabidopsis thaliana* : ils nécessitent des transporteurs à haute affinité pour Cu^+ , les COPT (copper transporters), localisés au niveau des apex des racines primaires et secondaires (Puig et al., 2007), parfois au niveau de la zone d'élongation et des poils racinaires.

Comme le cuivre est présent dans l'apoplasme sous la forme Cu^{2+} , il doit être réduit sous la forme Cu^+ pour passer la membrane plasmique via les transporteurs COPT1 et COPT2. Cette réduction est possible grâce à des protéines de la membrane plasmiques FRO (ferric réductase oxydase) qui réduisent également les ions Fe^{3+} (Puig et al., 2007) bien qu'il ne soit pas établi que ce soient strictement les mêmes protéines qui effectuent la réduction des 2 ions car elles pourraient être localisées à des endroits différents sur la racine selon l'ion (Bravin, 2008). La présence d'acide ascorbique provoque également la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ (Martins et al., 2012).

Tous les transporteurs membranaires de cuivre et leur fonctionnement biochimique ne sont pas encore connus (Martins et al., 2012). Dans les plantes, ce sont majoritairement des transporteurs COPT1 qui permettent au cuivre de franchir la membrane plasmique sous la forme Cu^+ . L'activité de ces transporteurs n'est pas pH-dépendante (Martins et al., 2012). Il semblerait que les transporteurs membranaires de Zn^{2+} , les ZIP puissent également transporter les ions Cu^{2+} , mais les avis semblent contradictoires à ce sujet (Clemens, 2001, Puig et al., 2007).

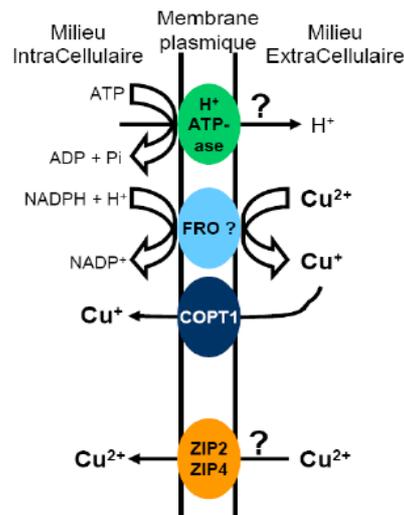


Figure 11: Transporteurs membranaires du cuivre impliqués dans l'absorption racinaire (Bravin, 2008)

Les transporteurs transmembranaires des métaux sont rarement spécifiques à un seul métal. Le transport d'un métal est donc en compétition avec d'autres ions dont H^+ et dépend donc du pH (Bravin, 2008). Il y a une compétition pour les sites d'adsorption racinaire entre H^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+} (Kinraide et al., 2004, Vulkan et al., 2004). L'affinité des membranes plasmiques pour Cu^{2+} est plus importante que pour Ca^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+} (Vulkan et al., 2004). Pourtant, l'absorption du cuivre est stimulée par Ca^{2+} et inhibée par Zn^{2+} (Martins et al., 2012). Pour $\text{pH} < 5$, les ions Al^{3+} plus solubles, entrent également en compétition avec les ions Cu^{2+} avec des effets rhizotoxiques semblables à ceux du cuivre.

1.2.5.3 Translocation du cuivre vers les parties aériennes

La distribution du cuivre entre parties aériennes et souterraines varie selon l'espèce, voire le cultivar, et en fonction des conditions environnementales (Loneragan, 1981).

Après avoir franchi les membranes plasmiques des cellules racinaires, l'ion Cu^+ est transporté vers les parties aériennes via le xylème sous forme complexé par des acides aminés (Brun et al., 2001) par l'histidine ou la nicotianamine (Clemens, 2001) ou des acides organiques comme le citrate ou le malate (Puig et al., 2007). La nicotianamine est aussi utilisée pour le transport de Fe^{2+} (Clemens, 2001), l'histidine est davantage présente dans les plantes plus tolérantes au cuivre (Clemens, 2001).

La concentration du cuivre dans le xylème et le phloème est à l'état de trace, soit environ $140 \mu\text{M}$, et semble corrélée à la concentration en acides aminés (Kabata Pendias, 2010). La translocation du cuivre dans la plante est donc probablement contrôlée par le métabolisme de l'azote (Brun et al., 2001). Le cuivre est ensuite stocké dans les vacuoles et d'autres organites cellulaires (figure 12) Le cuivre pénètre dans la cellule grâce au transporteur COPT1. Dans le cytoplasme, le cuivre est pris en charge par des chaperons (COX17, CCH, CCS, CpCCS) car les ions cupriques libres sont hautement toxiques pour la cellule. Les chaperons transportent le cuivre jusqu'aux enzymes Cu-dépendantes des organites ou vers la vacuole pour être stocké (Marschner, 1995, Clemens, 2001, Yruela, 2005). Des transporteurs spécifiques sont utilisés pour pénétrer dans les organites : COPT5 et RAN1 pour l'appareil de Golgi, COPT3, PAA1 et PAA2 pour les chloroplastes et COX17 pour les mitochondries (Yruela, 2005). Le cuivre pourrait également être transporté dans la vacuole et les chloroplastes grâce à des pompes à protons ATP-ases qui pourraient également être utilisées pour d'autres cations. (Martins et al., 2012, Yruela, 2005).

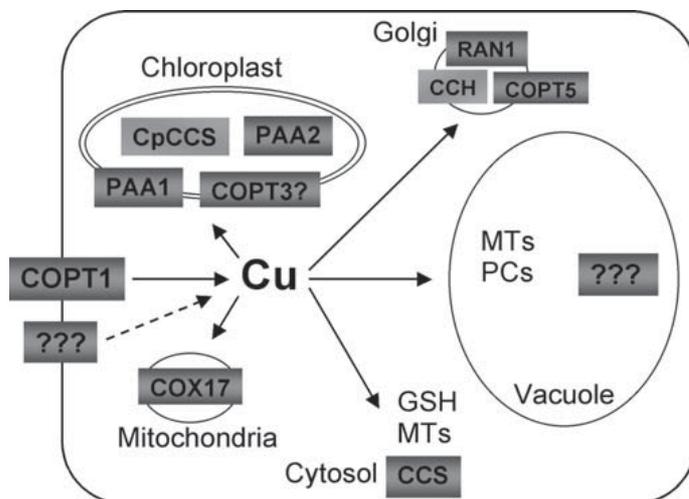


Figure 12: Différents chélateurs et transporteurs cupriques impliqués au niveau cellulaire (Yruela, 2005)

Lorsque le cuivre est en excès, il est pris en charge par des molécules plus spécifiques des métaux lourds comme les métallothionéines (MTs) et les phytochélatines (PCs) jusqu'à sa destination finale, généralement la vacuole (Yruela, 2005). Les métallothionéines sont des protéines riches en cystéine surtout présentes chez les plantes tolérantes au cuivre (Wei et al., 2008, Jack et al., 2007) et présentent une très forte affinité pour le cuivre (Banci et al., 2011). Les phytochélatines résultent de la réduction de glutathion (GSH) formé de glutamine, cystéine et glycine, sous l'effet du stress oxydatif engendré par une toxicité cuprique élevée (Wei et al., 2008). Dans la vacuole, le cuivre est pris en charge par des acides aminés, des acides organiques et des métallothionéines (Clemens, 2001). Le cuivre stocké dans la vacuole

peut être remobilisé par la plante si nécessaire, lorsqu'il n'y a plus de cuivre disponible dans le milieu (Martins et al., 2012).

Les gènes codant pour le transport des métaux dont le cuivre ont été en partie identifiés chez le riz, le sorgho et *Arabidopsis*. Ils s'expriment principalement dans les cellules du xylème (Migeon et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, les gènes codant pour les transporteurs membranaires plasmiques COPT1 et COPT2 sont réprimés par des concentrations élevées de cuivre, tandis que l'expression des gènes codant pour les transporteurs membranaires intracellulaires COPT3 et COPT5 n'est pas affectée par l'exposition au cuivre (Martins et al., 2012). Par contre, les gènes codant pour COPT1 et COPT5 pour le riz, sont activés en cas de déficience en cuivre. L'expression des gènes est donc modulée en fonction de conditions environnementales indépendantes pour chaque gène. Comme il existe plusieurs centaines de séquences codant pour différents types de transporteurs, des perspectives de sélection génétique sont possibles afin de pallier aux problèmes de carence ou de toxicité cuprique du sol (Migeon et al., 2010).

1.2.6 Stratégies de défense des plantes au risque de phytotoxicité cuprique

Les plantes ont développé des mécanismes d'homéostasie pour maintenir les concentrations en oligoéléments dans une gamme étroite. Pour gérer l'excès de cuivre, les plantes peuvent mettre en place plusieurs stratégies qui sont principalement l'exclusion et la séquestration. La stratégie la plus courante est l'exclusion (Lou et al., 2004).

L'exclusion consiste à limiter la pénétration des contaminants au niveau des racines. Il s'agit soit de produire des exsudats qui vont limiter la biodisponibilité des métaux (Hall, 2002), soit de les piéger dans les parois cellulaires pour limiter leur pénétration vers l'intérieur des cellules, et éviter leur transfert vers les parties aériennes plus sensibles pour protéger celles-ci. La plante peut diminuer la biodisponibilité du cuivre dans le sol grâce aux ligands organiques qui vont se complexer au cuivre, ou grâce aux exsudats racinaires permettant de modifier le pH (Hall, 2002). La plante peut aussi bloquer le cuivre sur les parois cellulaires en augmentant les charges négatives des parois, qui peuvent alors se lier aux cations métalliques (Wei et al., 2008). La plante limite également la concentration du cuivre dans les cellules racinaires en diminuant l'activité des transporteurs de cuivre de la membrane plasmique vers le cytoplasme ou en augmentant l'activité d'efflux du cuivre qui y a pénétré via des exsudats racinaires (Hall, 2002).

La séquestration consiste à lier le cuivre libre à des phytochélatines ou des métallothionéines pour limiter ses dégâts oxydatifs dans la plante puis à le bloquer dans les cellules en les stockant dans la vacuole ou dans des organes spécialisés (Clemens, 2001). La production de phytochélatines et de métallothionéines augmente en cas d'exposition à une teneur élevée en cuivre. Les phytochélatines sont des monomères de type Glutathion caractérisés par une structure de type $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ mais on peut également trouver $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Ala}$ $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ tandis que les métallothionéines sont des protéines riches en Cystéine (Clemens, 2001). Ces deux familles de molécules se lient au cuivre grâce à des groupements thiols. Des composés NPT (non protéine thiol content) pourrait également accroître la tolérance au cuivre en formant un complexe avec le cuivre afin de faciliter son transport du tonoplaste vers la vacuole (Wei et al., 2008).

Il y a souvent un mélange des deux stratégies (Lou et al., 2004, Rossini et al., 2009). Au niveau des feuilles, le cuivre s'accumule surtout dans l'épiderme des feuilles afin de protéger le tissu mésophylle des feuilles. Mais, il y a également une augmentation de la production de polyamines dans les parties aériennes, et d'acides aminés libres dans les 2 compartiments

aériens et racinaires, pour produire des enzymes limitant les dommages oxydatifs (séquestration).

La quantité de cuivre absorbée par la plante ne dépend pas seulement de la teneur en cuivre du sol mais également du génotype sélectionné par le biais de la variété choisie (Salvatore 2009). La plante ne doit pas seulement faire face à des stress abiotiques, mais également à des stress biotiques causés par les bio-agresseurs. Chaque espèce végétale a son cortège de bio-agresseurs.

1.3 Quelques généralités sur les interactions entre les plantes et leurs bio-agresseurs

Cette partie n'est pas exhaustive, elle doit juste permettre de comprendre la complexité des relations entre les plantes et les bio-agresseurs.

Il existe plusieurs catégories de bio-agresseurs : Les pathogènes (phytoplumes, virus, bactéries, oomycètes et champignons), les ravageurs directs (nématodes, insectes phytophages) ou les ravageurs indirects qui sont vecteurs de maladies. Les bio-agresseurs sont plus ou moins spécialisés sur des espèces végétales appelées plantes hôtes. En général, les cultures sont plus souvent la proie de ces bio-agresseurs que les plantes sauvages (Gols et al., 2008). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène : d'une part l'accès à une ressource abondante, concentrée sur de grandes parcelles est plus facile que de trouver des plantes hôtes dispersées dans des mosaïques paysagères (Ratnadass et Deguine, 2013) ce qui favorise la survie des bio-agresseurs tout en diminuant les habitats de leurs antagonistes (prédateurs et parasitoïdes). D'autre part, la longévité des ressources végétales cultivées d'une année sur l'autre, du fait de la diminution de la rotation des cultures ou parce que c'est une culture pérenne, est favorable à l'installation durable des bio-agresseurs. Des cultures pérennes, comme la vigne sont favorables aux ravageurs puisque hautement prévisibles dans l'espace et dans le temps. (Ratnadass et Deguine, 2013). Enfin, des variétés culturales à fort rendement ont été depuis longtemps sélectionnées pour leur croissance rapide au détriment de leur défense morphologique ou chimique face aux bio-agresseurs (Ratnadass et Deguine, 2013, Gols et al., 2008). Comme elles sont généralement fertilisées, leurs qualités nutritives azotées présentent un intérêt certain pour le succès reproducteur des bio-agresseurs.

A partir du milieu du 20^{ème} siècle, la lutte contre les bio-agresseurs a majoritairement reposé sur l'utilisation de pesticides de synthèse à large spectre d'action, du moins jusqu'à ce que les populations s'adaptent et développent des résistances à ces pesticides. Il a alors fallu multiplier les matières actives et leurs sites d'action afin de ralentir la capacité de contournement des bio-agresseurs. Mais les effets secondaires de ces produits sur les écosystèmes cultivés ont également été mis en évidence, notamment leur impact négatif sur les auxiliaires de cultures (Hardin et al., 1995). Depuis, des stratégies de lutte plus respectueuses de l'environnement sont recherchées : L'utilisation de pièges à phéromones ou le développement de variétés résistantes à un pathogène permettent de cibler spécifiquement une espèce nuisible et de limiter les effets non-intentionnels sur d'autres espèces. La modification de l'environnement parcellaire peut impacter le cortège de bio-agresseurs directement en étant défavorable aux ravageurs ou indirectement en favorisant l'installation d'auxiliaires de cultures. Cette adaptation de l'environnement parcellaire peut se traduire par l'intégration des parcelles dans une mosaïque paysagère (Collins et al., 2003, Jervis et al., 2005, Smith et Liburd, 2012), la mise en place de bandes fleuries ou de haies en bordure de parcelles (Decante et al., 2009, Funderburk et al., 2011) ou l'augmentation de la diversité des cultures (Hook et Johnson, 2003) grâce aux cultures associées, aux mélanges variétales (Khan et al., 1997, Nyoike et Liburd, 2010) ou la rotation parcellaire. De même, le recours à

la lutte biologique basée sur l'utilisation des ennemis naturels des cultures (Letourneau et al., 2009) et visant à rétablir les équilibres trophiques par la stimulation des défenses naturelles des plantes est en plein essor. Autant de domaines qui nécessitent au préalable de bien connaître les interactions entre les plantes hôtes et leur cortège de bio-agresseurs.

1.3.1 Généralités sur les processus de sélection de la plante hôte par les insectes

Les interactions plante/bio-agresseurs dépendent à la fois de facteurs biotiques (ressources alimentaires, cycle de vie de l'espèce de bio-agresseur, sensibilité des variétés végétales utilisées, hétérogénéité des populations et des phénotypes) et de facteurs abiotiques (conditions climatiques, sol, topographie). Les critères de choix par l'insecte de la plante hôte dépendent de l'espèce de bio-agresseur, de son mode de vie et de sa stratégie reproductrice globale. Les plantes hôtes peuvent par exemple servir de sites d'accouplement, de site de ponte, de refuge ou de nutrition (Thiéry et al., 2013a). Si certains bio-agresseurs spécialistes monophages sont inféodés à une seule espèce de plante hôte, d'autres, les oligophages, le sont vis à vis d'espèces de plantes de différents genres mais appartenant à la même famille végétale. Enfin, les généralistes polyphages s'alimentent sur des plantes hôtes de différentes familles végétales (Schoonhoven et al., 1998, Bernays et Chapman, 1994). Les insectes généralistes peuvent davantage s'adapter aux systèmes culturaux variables dans le temps (Kennedy et Storer, 2000). Mais compte tenu de nos systèmes de production spécialisés par région, de la faible variété d'espèces cultivées annuelles ou pérennes, environ 75 % des insectes phytophages sont des spécialistes (Bernays et Chapman, 1994). Pour survivre, leur cycle de vie doit être en phase avec celui de leurs plantes hôtes afin de pouvoir bénéficier au mieux de l'abondance de la ressource que ce soit pour s'alimenter ou assurer la survie de sa descendance. En outre, du fait de leur co-évolution avec la plante hôte (Ferreira et al., 2007), les spécialistes parviennent mieux à contourner les défenses de la plante en s'adaptant notamment aux molécules secondaires de défense ou toxines qu'elle produit (Gols et al., 2008, Moreau et Thiéry, 2013).

Les bio-agresseurs qui peuvent maîtriser leurs déplacements, peuvent d'avantage localiser et choisir leur plante hôte que ceux dont la distance de déplacement est faible ou plus aléatoire, ce qui est par exemple le cas des insectes qui subissent plus ou moins passivement les déplacements d'air. Pour les insectes phytophages, la localisation de la plante hôte s'effectue en premier lieu à distance en fonction de caractéristiques olfactives et visuelles, puis la sélection de l'organe de l'hôte est confirmée en fonction de caractéristiques tactiles de mécanoréception et de gustation au contact de la plante (figure 13) (Maher, 2002). Il peut y avoir des interactions entre les stimuli visuels et olfactifs pour trouver plus aisément la plante hôte (Todd et al., 1990).

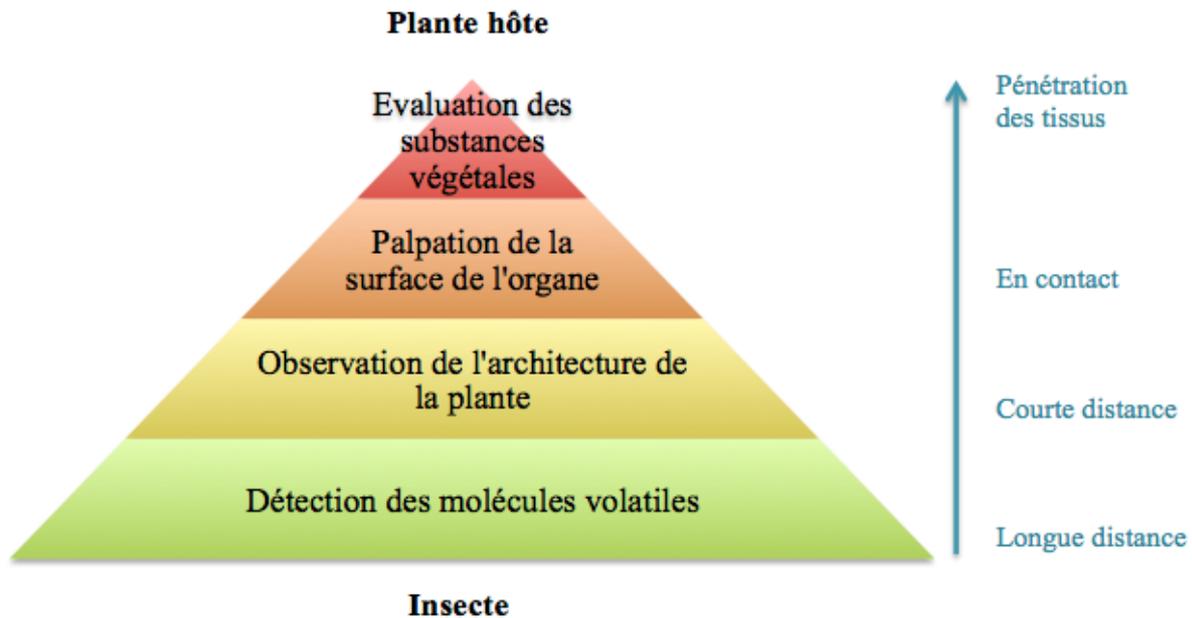


Figure 13: Principaux critères de sélection de la plante hôte par les insectes en fonction de la distance

En fonction des caractéristiques perçues, l'insecte détermine la nature de la plante et si celle-ci sera propice à sa nutrition ou à son développement (Dethier, 1982, Miller et Strickler, 1984, Renwick et Huang, 1994), ou au développement de sa progéniture. Si les généralistes sont plutôt attirés par des plantes présentant peu de stimuli négatifs (barrières physiques, composés répulsifs, toxines), la présence de caractéristiques spécifiques de la plante hôte notamment les composés volatils sont indispensables aux spécialistes pour formaliser leur choix (Bernays et Chapman, 1994, Schoonhoven et al., 1998, Städler, 2002).

Les capacités de sélection des plantes hôtes par les insectes sont intimement liées aux capacités sensorielles (détection des signaux et intégration centrale) des insectes considérés, de la performance des modalités sensorielles dont ils disposent, mais aussi des registres comportementaux qu'ils peuvent élaborer. Une autre composante clé de la spécificité est la durée de vie, qui lorsqu'elle est élevée permet d'accumuler les expériences et donc d'améliorer les performances sélectives.

Olfaction

L'olfaction est une modalité sensorielle majeure chez les insectes pour trouver leur partenaire sexuel, leur progéniture, leur proie ou une plante hôte (Visser, 1986, Todd et al., 1990). L'olfaction est utilisée par l'insecte pour s'orienter et lorsqu'il est en contact de la plante hôte pour évaluer sa qualité (Todd et al., 1990). Les composés volatils émis par une plante sont composés de 6 à 20 atomes de carbone et doivent être de taille inférieure à 400 daltons pour pouvoir être impliqués dans l'attraction des insectes à distance. D'autres molécules plus lourdes prédominent à la surface des plantes (Thiéry et al., 2013a).

Chaque espèce végétale a une composition odorante spécifique (Todd et al., 1990). L'attractivité d'une plante peut alors dépendre de la production de quelques composés volatils particuliers ainsi que de cocktail de molécules volatiles ubiquitaires dans des proportions bien définies (Visser, 1986, Bruce et al., 2005), ces deux types d'identité olfactive se complétant dans de nombreux cas. Si cette composition est modifiée qualitativement ou quantitativement, le choix d'une espèce végétale ou d'une plante individuelle par l'insecte peut également être modifié radicalement, passant parfois du statut d'attractive à répulsive (Thiéry et al., 2013a).

Dans le cas d'une attraction par un cocktail de molécules, la présence d'une seule de ces molécules seulement entraîne une attractivité plus faible (Ngumbi et al., 2007). Paradoxalement, le mélange de deux molécules peut être rébarbatif alors que ces molécules sont attractives séparément (Chapman et al., 2003). Il y a donc des processus d'inhibition concentration-dépendante (Chapman et al., 2003).

La reconnaissance des composés volatils nécessite, d'une part un organe sensoriel sophistiqué, d'autre part un équipement cérébral performant capable de traiter l'information instantanément et de la mémoriser. Ce sens est particulièrement développé chez de nombreux insectes (Renwick et Chew, 1994), notamment les insectes nocturnes. Chez d'autres insectes comme les cicadelles, c'est le facteur visuel qui prédomine dans le choix de la plante hôte, l'odeur joue alors plutôt un rôle de fixateur sur la plante (Chuche, 2010) à très courte distance.

Vision

Les insectes sont sensibles à la fois à la qualité spectrale (350 à 650 nm), à la dimension et la forme de la plante (Maher, 2002), mais aussi à son contraste par rapport à la végétation environnante.

Certains insectes sont plus attirés par certaines couleurs, certaines teintes que d'autres. Ainsi, les couleurs sombres comme le rouge, le bleu ou le noir, miment les fruits mûrs et sont plutôt recherchées pour des sites de ponte (Thiéry et al., 2013). Le vert est attractif pour de nombreux phytophages car il témoigne d'une bonne capacité photosynthétique de la plante et donc d'une meilleure qualité de sève élaborée (Todd et al., 1990, Decante et al., 2009). Le jaune qui semble plus attractif pour tous les insectes phytophages en quête de nourriture, est davantage associé au feuillage (Thiéry et al., 2013). De ce fait, le jaune est la couleur qui est le plus souvent retenue pour les pièges contre les insectes ravageurs de culture. Par exemple, les cicadelles de la flavescence dorée préfèrent d'abord le jaune puis le vert et nettement moins le rouge et le bleu (Chuche, 2010). Le jaune qualifiant ainsi davantage les jeunes feuilles, plus riches en azote (Mooney et Gulmon, 1982). Toutefois, l'attractivité par les couleurs évolue elle aussi au cours du temps puisque la larve cherche à s'alimenter sur jeunes feuilles tandis que l'adulte cherche des lieux de pontes sur bois. Or, La composition pigmentaire qui influence la teinte foliaire, varie en fonction du stress hydrique et de la composition nutritionnelle de la plante ainsi que de la présence de cires à la surface des feuilles (Prokopy et Owens, 1983).

L'architecture de la plante joue aussi un rôle important ; certains insectes choisissent préférentiellement des plantes dont les rameaux forment un angle de 45 °C (Picaud et al., 2003), d'autres préfèrent les plantes vigoureuses caractérisées par une densité foliaire plus importante et un taux de chlorophylle plus important (Decante et al., 2009).

La structure des feuilles elle-même est prépondérante dans le choix des phytophages. Ainsi, l'épaisseur de la cuticule, la longueur et la densité des stomates, la surface de la feuille et la distance par rapport aux tissus lignifiés sont pris en compte pour la sélection de la plante hôte (Peeters, 2002). Les insectes phytophages consommateurs de feuilles, choisissent préférentiellement des jeunes feuilles plutôt que des feuilles matures car elles sont plus riches en eau et en azote, deux éléments essentiels à leur croissance et au développement rapide des larves (Coley et al., 2006). La prise de contact avec la plante permet ensuite de conforter ou non le choix de la plante hôte et de l'organe.

Toucher, ou mécanoréception par contact.

Lorsque l'insecte entre en contact avec la plante, il perçoit des signaux physiques et chimiques qui lui permettent d'évaluer la qualité de la plante hôte grâce à des contacts tactiles répétés avec ses pattes, ses antennes, ses pièces buccales ou son ovipositeur (Maher, 2002). Seuls les stimuli présents en surface de la plante sont évalués. La morphologie, la texture et la structure des cires épicuticulaires sont les principales caractéristiques de la surface de la plante hôte évaluées par l'insecte (Schoonhoven et al., 1998). Ainsi certains insectes comme *Lobesia botrana* recherchent une structure lisse tandis que d'autres comme *Helicoverpa zea* ont besoin de la présence de poils pour leur ponte (Ramaswamy, 1988). Pour la ponte, une évaluation supplémentaire de la qualité des tissus (résistance et composition chimique) peut également être effectuée (Schoonhoven et al., 1998). Plus la feuille est mature, plus ses défenses physiques sont développées et efficaces (Peeters, 2002). Les insectes broyeurs peuvent se nourrir de différents types de tissus végétaux (racines, feuilles, fruits, ou bois), mais ceux se nourrissant de feuilles recherchent plutôt les feuilles de grandes surfaces, présentant de grands espaces tissulaires non lignifiés, l'absence de cuticule épaisse ainsi que l'absence de vaisseaux lignifiés ou de glandes sur les feuilles (Peeters, 2002). Les insectes piqueurs/suceurs, se nourrissent soit de xylème, soit de phloème, soit ont un régime mixte. Ces deux compartiments présentent des caractéristiques très différentes (pression, quantité de nutriments, présence ou non de molécules de défense). Ces insectes recherchent des feuilles présentant des cuticules et des lamelles les moins épaisses possibles avec des vaisseaux conducteurs proches de la surface facilement accessibles (Peeters, 2002). Les insectes foreurs sont les moins exigeants : ils favorisent les feuilles sans glandes sécrétrices de métabolites secondaires qui possèdent des tissus mésophylles riches en protéines (Peeters, 2002). Toutefois, les stimuli tactiles ne sont pas les seuls facteurs pris en compte lors du contact, les facteurs chimiques perçus par le système gustatif sont également importants.

Gustation

Le système sensoriel gustatif est décentralisé (à l'exception des larves) contrairement au système olfactif. Les structures de détection gustatives sont situées sur tout le corps de l'insecte adulte et principalement sur les organes également utilisés pour le contact tactile (pièces buccales, pattes, ovipositeur). En effet, l'insecte perçoit des substances chimiques non volatiles au niveau de la cuticule et de la couche cireuse qui la recouvre. C'est la synergie de plusieurs substances chimiques différentes perçues par l'insecte qui lui permettent d'accepter ou non la plante hôte (Honda, 1995, Städler, 2002,). Comme la distribution des substances n'est pas uniforme et le plus souvent en faible concentration, l'insecte sonde pendant un petit moment la surface de l'organe sur lequel il est posé avant de se fixer (Maher, 2002).

Les substances issues du métabolisme secondaires (comme les glucosinolates, les phénols, les flavonoïdes, les coumarines, les stéroïdes, les saponines, les alcaloïdes ou les quinones) sont le plus souvent utilisées par l'insecte pour reconnaître l'espèce végétale de la plante hôte, tandis que les substances issues du métabolisme primaire (sucres, acides aminés, lipides) ou les sels minéraux lui permettent de choisir l'individu puis l'organe adéquat en fonction de ses besoins (Städler, 2002, Wright et al., 2001). Ce sont généralement les phytophages spécialistes, parfois les généralistes, qui possèdent des récepteurs spécifiques aux molécules caractéristiques de leur plante hôte. Par exemple le sorbitol permet de reconnaître les rosacées et le dulcitol le fusain (Chapman et al., 2003).

Les récepteurs permettant de reconnaître les substances primaires sont répandus chez la plupart des phytophages. Les insectes sont équipés de récepteurs sensibles aux acides aminés et peuvent reconnaître les acides aminés essentiels pour eux : la sérine, la lysine, la leucine, la

proline et l'alanine sont considérées comme attractives tandis que la méthionine et la phénylalanine sont plutôt dissuasives (Chapman et al., 2003). Mais la sensibilité à certains acides aminés varie selon les phytophages. La teneur en proline considérée comme un signe de stress hydrique de la plante permet à l'insecte de choisir la feuille la plus appropriée (Chapman et al., 2003). Tous les insectes phytophages, quel que soit leur stade de développement, possèdent des récepteurs sensibles à la teneur en sucres et tous favorisent une teneur en sucre élevée (Chapman et al., 2003). Les insectes sont attirés par la présence de NaCl et KCl mais des concentrations en sels trop élevées deviennent dissuasives (Chapman et al., 2003). Les vitamines sont généralement dissuasives bien que les insectes ne semblent pas posséder de récepteurs spécifiques pour les détecter (Chapman et al., 2003).

Les insectes phytophages amateurs de sève, et plus particulièrement les insectes piqueurs-suceurs, consomment en général préférentiellement le phloème, riche en acides aminés et en sucres et dont la pression osmotique leur est favorable. Toutefois certains insectes dont *S. titanus* consomment également le xylème, de plus faible qualité nutritive, mais riche en eau et en certains éléments minéraux comme le calcium, le sodium, le bore (Chuche, 2010, Chuche et Thiéry, 2014, Chuche et al. 2014).

La composition des organes varie au cours du temps. Les jeunes organes sont souvent plus riches en nutriments, notamment en acides aminés essentiels et produisent encore peu de métabolites secondaires de défense. Leur consommation permet un développement plus rapide du phytophage (figure 14) et un meilleur succès reproducteur, c'est pourquoi ces organes sont préférentiellement consommés (Karley et al., 2002, Bi et al., 2007).

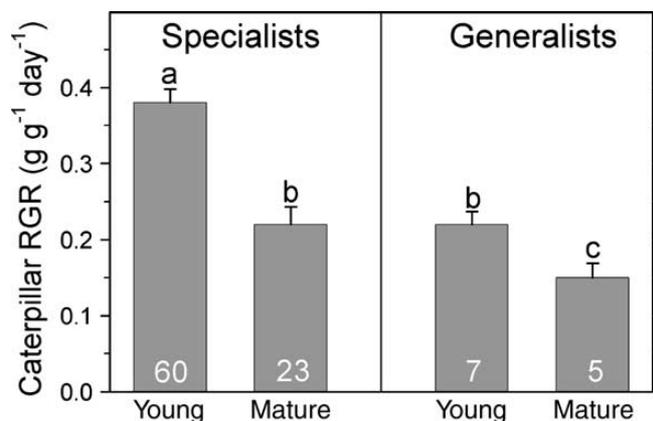


Figure 14: Taux de croissance relative (RGR) de chenilles lépidoptères spécialistes ou généralistes, nourries sur des jeunes feuilles ou des feuilles âgées de 37 plantes (Coley et al., 2006)

Néanmoins, certains phytophages consomment plutôt les feuilles plus âgées, riches en molécules secondaires de défense, afin d'accumuler ces molécules dans leur propre organisme pour se protéger de leurs ennemis naturels (Coley et al., 2006).

Le choix d'un organe dépend aussi du stade de développement de l'insecte et de son sexe. Ainsi, les larves de *Scaphoideus titanus* ont un meilleur taux de croissance lorsqu'elles peuvent se nourrir sur de jeunes feuilles qui présentent une meilleure qualité nutritionnelle du fait de l'abondance de la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine. Par contre, les adultes s'alimentent préférentiellement sur les feuilles plus âgées, plus énergétiques car plus riches en saccharose (Chuche, 2010). Chez les adultes, il existe également des différences en fonction du sexe : les femelles de *Lobesia botrana* élevées sur le vignoble Gamay ont un meilleur taux de fertilité et de fécondité alors que les mâles élevés sur ce même cépage ont un taux de fertilité plus faible. Tandis que les œufs issus de femelles élevées sur Pinot ont un taux

d'éclosion plus faible que celles élevées sur d'autres cépages, alors que les œufs ayant été produits avec des mâles élevés sur Pinot ont un taux d'éclosion plus important. Ainsi, il semblerait que les nutriments nécessaires à la reproduction ne sont pas les mêmes pour les mâles et les femelles (Moreau et al., 2007). Enfin, de nombreuses espèces d'insectes hébergent des symbiontes (micro-organismes de la flore microbienne) qui jouent un rôle important dans l'exploitation de la ressource. Ils peuvent par exemple produire des acides aminés essentiels, et ainsi s'affranchir davantage de la qualité nutritionnelle de leur plante hôte (Chuche, 2010).

Goûter la nourriture est primordial pour le choix de la plante hôte pour les insectes. Les insectes piqueurs n'hésitent pas par exemple à piquer la plante en plusieurs endroits afin de goûter le contenu cellulaire de différents tissus avant d'établir leur choix (Thiéry et al., 2013b). C'est la comparaison entre les stimuli positifs et les stimuli négatifs qui détermine leur choix de leur plante hôte (Chapman et al., 2003). L'absence de stimuli négatif est perçu comme une permission d'alimentation ou de ponte (Chapman et al., 2003).

Les critères de choix des insectes reposent principalement sur les métabolites produits par la plante et de leur facilité d'accès via les caractéristiques physiques de l'espèce végétale, et donc dépendent d'une part du stade phénologique, du génotype de la plante et d'autre part de facteurs édaphiques via son alimentation.

1.3.2 Critères de reconnaissance de la plante hôte par les agents pathogènes

Les agents pathogènes ne sont pas autonomes à la différence des ravageurs. A défaut de pouvoir choisir l'individu hôte, ils ont sélectionnés les vecteurs de dispersion les plus appropriés à leur environnement. Ils ont également développés des stratégies d'infection adaptées à leur plante hôte afin d'assurer leur survie. Dans ce chapitre, les infections par les bactéries et les virus ne sont pas abordées.

Dispersion

Leur mode de dispersion varie donc considérablement d'une espèce à l'autre. Il repose tantôt sur des vecteurs biotiques (animaux, homme), tantôt sur des vecteurs abiotiques (vent, eau) et parfois sur les deux (figure 15).

En fonction du vecteur utilisé et du type de spore produit, la dispersion peut avoir lieu de quelques centimètres (en cas d'éclaboussure par les gouttes de pluies) à plusieurs centaines de kilomètres (vent).

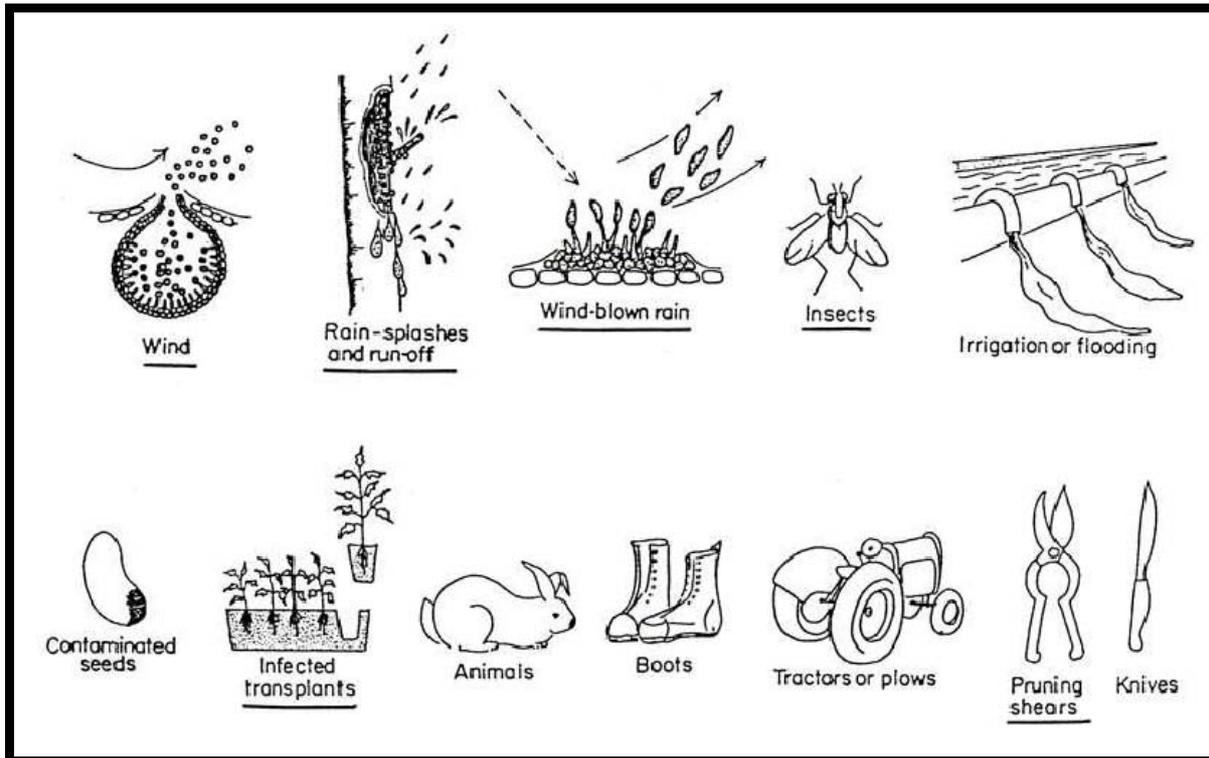


Figure 15: Principaux modes de dispersion utilisés par les pathogènes (Rapilly F., 1991)

1.3.2.1 Infection par un phytoplasme : l'exemple de la vigne.

Les phytoplasmes sont des mollicutes, c'est à dire, des «bactéries» sans paroi cellulaire. Ce sont des parasites intracellulaires stricts qui ont besoin d'utiliser l'activité métabolique des cellules qu'ils infectent pour vivre. Ils peuvent se reproduire à la fois dans des cellules végétales (phloème) ou animales (tous les organes des insectes piqueurs suceurs de phloème) (Christensen et al., 2005). La classification des phytoplasmes repose sur des variabilités au niveau de l'ARNr 16S. On connaît l'existence d'environ 750 espèces de phytoplasmes. Tous les insectes vecteurs de phytoplasmes appartiennent aux hémiptères phloémophages (Weintraub et Beanland, 2005). Certains phytoplasmes ne sont transmis que par une seule espèce de vecteur, d'autres par un grand nombre de vecteurs (Christensen et al., 2005). Un insecte doit d'abord s'alimenter sur une plante contaminée par un phytoplasme pour l'acquérir puis devenir un vecteur de transmission du phytoplasme sur une plante saine. Pour ce faire, plusieurs conditions doivent être réunies. Il semble que l'acquisition du phytoplasme par l'insecte dépende de l'espèce de la plante hôte, voire de la variété. Ainsi, l'acquisition du phytoplasme de la flavescence dorée est plus aisée par *S. titanus* sur la fève que sur la vigne (Bressan et al., 2005). Sur vigne, les cépages plus sensibles au phytoplasme semblent également de meilleures sources d'inoculum (Bressan et al., 2005c d'après Chucho, 2010). L'acquisition du phytoplasme par l'insecte peut se faire dès l'éclosion, lors des premiers stades larvaires de l'insecte (Bressan et al., 2006).

La prise alimentaire de l'insecte dans le phloème de la plante contaminée doit être suffisamment longue pour permettre au phytoplasme de passer de la plante infectée à l'insecte (Boudon-Padieu et al., 1989). Plus la prise alimentaire est longue, plus les chances d'acquisition du phytoplasme par l'insecte augmentent (figure 16).

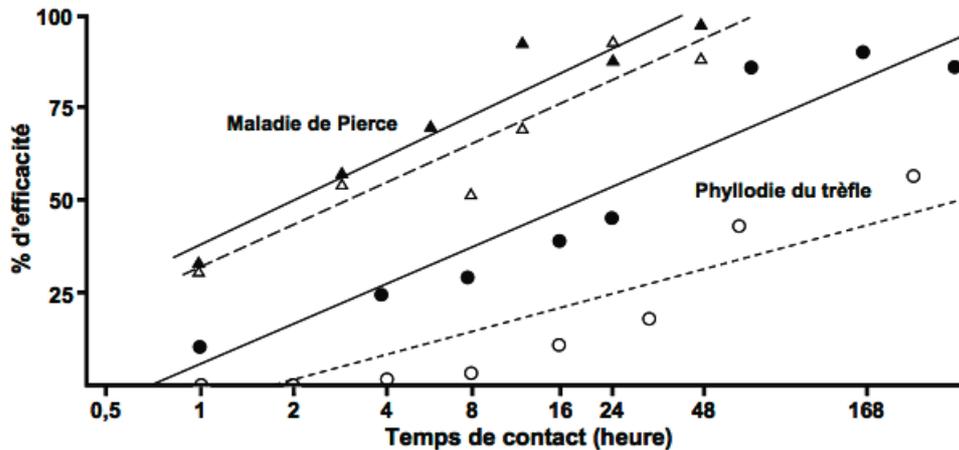


Figure 16: Pourcentages d'efficacité d'acquisition (traits pleins) et d'inoculation (traits pointillés) d'un agent pathogène en fonction du temps de contact entre le vecteur et la plante (Purcell, 1982 cité par Chuche, 2010)

Puis le métabolisme de l'insecte doit être compatible avec celui du phytoplasme pour garantir sa survie et sa multiplication ; c'est pourquoi tous les insectes phytophages ne sont pas vecteurs de tous les phytoplasmes. Après avoir pénétré dans les pièces buccales, le phytoplasme franchit la barrière intestinale puis colonise tous les organes de l'insecte par le biais de l'hémolymphe. La période d'incubation nécessaire au phytoplasme pour coloniser tout le corps de l'insecte et se multiplier est variable selon le phytoplasme et l'insecte cible (figure 17), mais nécessite au moins une dizaine de jours, voir un mois (Boudon-Padiou, 2000, Beanland et al., 2006). Les glandes salivaires servent de site de multiplication intense pour le phytoplasme, de manière à pouvoir facilement infecter une plante saine lors de la prochaine prise alimentaire de l'insecte (Chuche, 2010). Lorsque l'insecte a acquis le phytoplasme, il reste un vecteur de contamination à vie (Christensen et al., 2005).

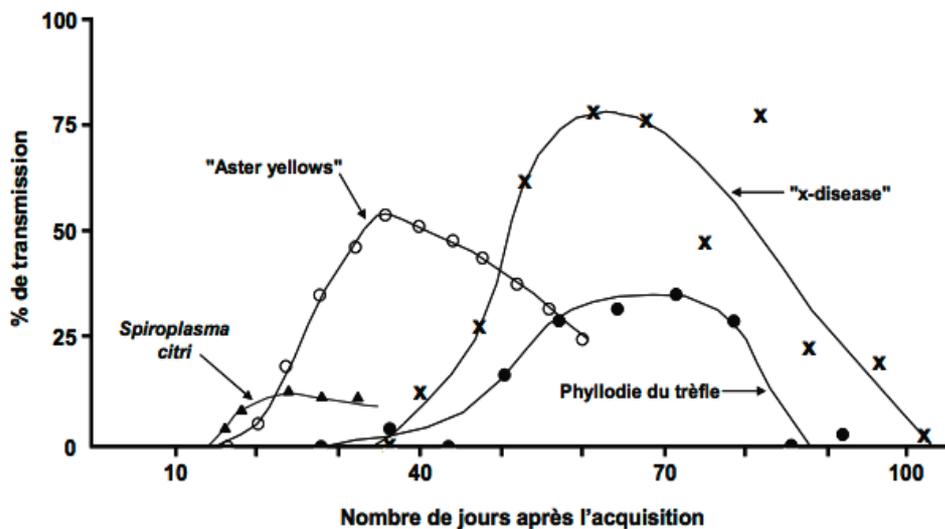


Figure 17: Pourcentage d'efficacité de transmission de différents agents pathogènes en fonction du nombre de jours après son acquisition par le vecteur (Purcell, 1982 cité par Chuche, 2010)

La transmission du phytoplasme par l'insecte à une plante saine se fait par le biais des pièces buccales : les phytoplasmes sont injectés dans le phloème lors de la prise alimentaire. Une partie va coloniser les feuilles en croissance pour assurer leur dissémination, une autre va coloniser les racines qui serviront de réserve d'inoculum pour le printemps suivant (Caudwell et al., 1970).

L'agent pathogène peut, dans certains cas, influencer le vecteur de manière à optimiser ses capacités de transmission. Ainsi, les phytoplasmes peuvent modifier les caractéristiques de la plante (couleur, architecture, composés volatils, composition en acides aminés) pour renforcer l'attraction sur les insectes vecteurs afin de favoriser leur transmission (Hodge et Powel, 2008, Hoshi et al., 2009, Mayer et al., 2008, Ngumbi et al., 2007). Les cicadelles de la flavescence dorée sont ainsi plus attirées par les vignes atteintes par la flavescence dorée que par les vignes saines (Chuche, 2010), et le psylle *Cacopsylla picta* par l'odeur d'une pomme contaminée par le phytoplasme responsable de la maladie de la prolifération du pommier (Mayer et al., 2008).

1.3.2.2 Infection par un champignon ou un pseudo-champignon pathogène

L'infection par un champignon est possible lorsque la spore a rencontré un hôte acceptable. Lors du dépôt sur l'individu hôte, le pathogène évalue son niveau d'acceptabilité. S'il est bon, la spore germera ; dans le cas contraire, elle restera à l'état de spore en attendant une dispersion ultérieure. La spore est la phase de conservation généralement utilisée par le pathogène. En fonction du type de spore, sa survie peut être de quelques heures (zoospores) à une centaine de jours (ascospores) (Jailloux et al., 1999) ou plusieurs mois (pycnides) (Gubler et al., 2004). Dans certains cas, c'est l'hôte lui-même qui provoque la levée de la dormance de la spore, comme par exemple les exsudats racinaires sur les sclérotés (Burgess et Hepworth, 1996) ou son environnement (microflore de la rhizosphère).

Lorsque les spores germent un tube germinatif apparaît. Celui-ci commence par se fixer à la surface de l'hôte en produisant du mucilage (matériel adhésif) puis secrète des enzymes cellulases, estérases et cutinases afin de permettre la formation d'un appressorium (figure 18). Parfois, des pressions mécaniques sont également exercées à la surface de la plante. Un mycélium se forme puis se ramifie afin de coloniser la plante. Chez les parasites biotrophes, certaines de ces ramifications lui permettent de se fixer à la plante. D'autres, les suçoirs, pénètrent dans les cellules voisines afin de prélever les nutriments nécessaires à la croissance du mycélium (Jürges et al., 2009, Dubos, 2002).

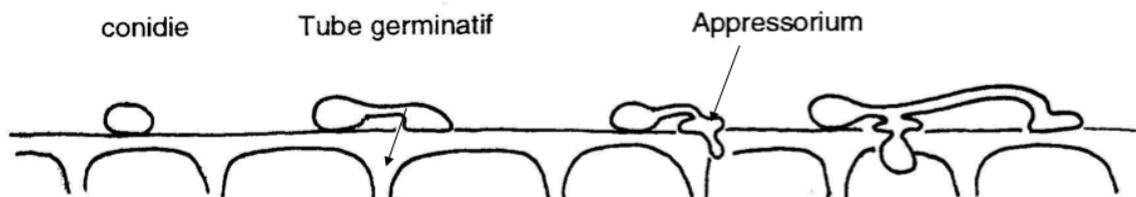


Figure 18: Phase de fixation du champignon pathogène sur l'hôte (Clerjeau M., INRA)

La survie du champignon dépend de sa rapidité à pénétrer les parois cellulaires végétales et à atteindre leur contenu cellulaire (Mellersh et al., 2007), mais il peut également rencontrer des résistances de la part de son hôte. Il peut avoir des difficultés à pénétrer dans les parois cellulaires renforcées par des composés phénoliques, de la silice, des glycoprotéines riches en hydroxyproline (Mellersh et al., 2007) ou la formation de gels de pectate de calcium (Kieffer et al., 2000). Il peut également être confronté à des dépôts de callose entre la paroi et la membrane plasmique ou à la production de réactifs oxydants extracellulaire par des protéines des parois cellulaires (Thordal-Christensen et al., 1997). La production de H₂O₂ inhibe la croissance de la plupart des champignons soit directement par son action oxydante très efficace, soit en servant de signal à la production de composés phénoliques ou à des modifications des parois cellulaires (Mellersh et al., 2007). Ainsi, pour contrer le renforcement des parois cellulaires végétales, le champignon de l'antracnose de la tomate

exerce une pression mécanique plus forte grâce à des appressoria dont la paroi mélanisée est plus rigide (Bechinger et al., 1999 cité par Mellersh et al., 1997). Certains champignons comme *Streptomyces sp.* excrètent dans le milieu extracellulaire de la tyrosinase afin de bloquer les effets délétères des composés phénoliques produits par les systèmes de défenses des plantes (Yang et al., 2009).

Les microorganismes parasites nécrotrophes produisent des enzymes cellulases, polygalactorunases et pectatylases qui dégradent la cellulose et la pectine des parois cellulaires des cellules végétales. Lorsque la paroi végétale est déstructurée, le pathogène pénètre plus facilement dans les tissus végétaux grâce à des enzymes hydrolytiques. Le pathogène nécrotrophe tue les cellules végétales en avant du front d'avancement du micro-organisme, puis colonisent les tissus morts. Les composés pectiques libérés sont alors utilisés comme source de carbone. Après quelques jours d'incubation, une partie du mycélium se différencie en sporanges. C'est la phase de sporulation nécessaire à la dissémination prochaine des spores du champignon (Dubos, 2002). La durée de la phase d'incubation varie en fonction du pathogène et des conditions environnementales (température, humidité, photopériode). Lorsque les conditions deviennent trop défavorables, le champignon sporule plus rapidement.

Or, les plantes régissent aux attaques en développant à leur tour des systèmes de défenses préjudiciables aux bio-agresseurs.

1.3.3 Systèmes de défenses des plantes contre les bio-agresseurs

Les plantes doivent faire face à différents stress environnementaux qu'ils soient biotiques (carence alimentaire, sécheresse, salinité..) ou biotiques (ravageurs, pathogènes, herbivores, compétitivité entre espèces, voire entre individus de même espèce). L'adaptation à chacun de ces stress présente un coût énergétique élevé, c'est pourquoi, la plante investira plus ou moins pour répondre à un stress en fonction de la gravité des dommages occasionnés ou de leur fréquence (Stamp, 2003, Kelly et Hanley, 2005, Behmer et al., 2002 cité par Alonso et al., 2009). Les stratégies des plantes vis à vis des bio-agresseurs varient en fonction des espèces végétales (figure 19). On distingue la stratégie de défense et la stratégie d'échappement.

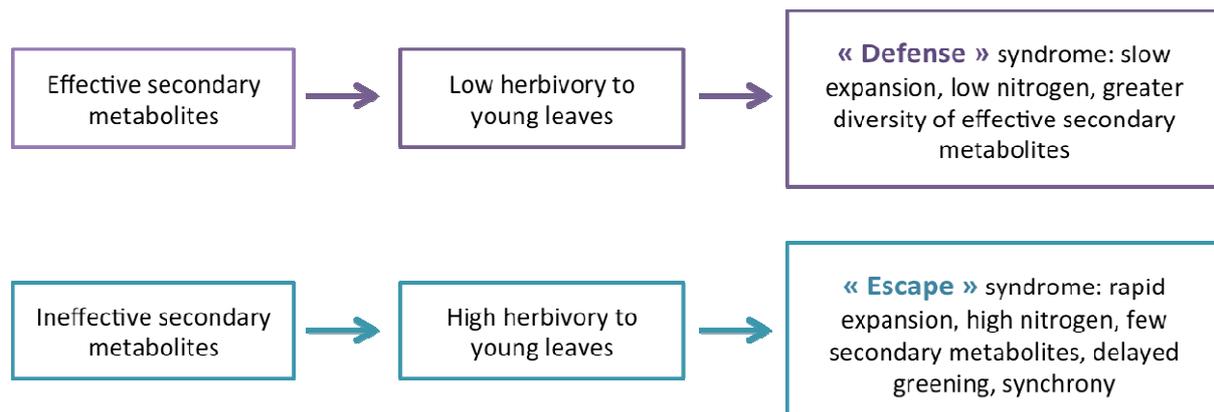


Figure 19: Différences entre les stratégies de défense et d'échappement des plantes sur les jeunes feuilles (Kursar et Coley, 2003)

Les plantes ayant une stratégie de défense, ont une croissance lente ou des feuilles persistantes et investissent davantage dans des systèmes de défense physiques et chimiques pour lutter contre les bio-agresseurs, ce qui permet de limiter les dégâts foliaires à 20% (Kursar et Coley, 2003).

Tandis que les plantes ayant une stratégie d'échappement, retardent leur cycle biologique, facilitent la dispersion des graines dans l'espace, ont une croissance rapide, des feuilles plus riches en nutriments, une défense chimique inexistante ou inefficace et cherchent davantage à compenser les pertes importantes (jusqu'à 60% sur feuilles) dues aux bio-agresseurs (Kursar et Coley, 2003) par la production de nouvelles feuilles (Peeters, 2002). Il ne semble pas y avoir d'espèces végétales ayant à la fois une croissance rapide et de très bonnes défenses contre les bio-agresseurs (Kursar et Coley, 2003). Cela s'explique pour le coût énergétique élevé que nécessitent la mise en place et la maintenance de défenses par la plante qu'elles soient physiques ou chimiques comme la production de lignine, de terpènes et de composés phénoliques (Mooney et Gulmon, 1982).

Dans le cas de stress occasionné par des bio-agresseurs, les plantes ont mis en place principalement deux types de défense. Les défenses constitutives, c'est à dire passives ou préventives, qui reposent essentiellement sur des barrières physiques et dans une moindre mesure sur des barrières chimiques basée sur l'émission de molécules chimiques répulsives ou toxiques (alcaloïdes principalement) ou diminuant l'appétence. A l'inverse, les défenses induites à vocation curative se déploient à posteriori, après que le contact avec le bio-agresseur ait été établi. Il s'agit alors principalement de défenses chimiques locales, systémiques ou basées sur l'émission de composés volatiles susceptibles d'attirer des prédateurs ou des parasitoïdes des bio-agresseurs. Les défenses chimiques de la plante reposent principalement sur ses métabolites secondaires qui jouent surtout un rôle au niveau de l'épiderme et du mésophylle (Boubakri et al., 2012, Thiéry et al., 2013b) alors que la cuticule végétale joue un rôle majeur dans la diffusion et l'adsorption des molécules volatiles (Thiéry et al., 2013b).

1.3.3.1 Barrières physiques

La morphologie de la feuille ou de la tige, la répartition de ses nervures, sa pilosité, sa rugosité, la présence de cires à sa surface ou l'épaisseur de son épiderme peuvent constituer des barrières physiques importantes à opposer aux bio-agresseurs.

La morphologie de la feuille influence le microclimat autour de la plante et peut donc s'avérer plus ou moins favorable au développement des pathogènes. Ainsi, une feuille étroite d'une part diminue l'humidité relative à sa surface (Vaissayre et al., 2013) ce qui est défavorable aux maladies fongiques, et d'autre part réduit la surface de contact. De même, une faible densité foliaire limitera les effets rafraichissants de l'évapotranspiration et d'ombres favorables à la survie des larves d'insectes, notamment lors d'été chauds (Decante et al., 2009). La présence de nombreuses nervures peut également limiter la colonisation du pathogène comme pour *Plasmopara viticola* sur vigne. La pilosité d'une feuille gêne le déplacement du ravageur ce qui le rend plus vulnérable à ses prédateurs, limite la surface de ponte et l'accès à l'alimentation comme pour *Typhlocybinæ* sur cotonnier (Eittipibool et al., 2001 cité par Vaissayre et al., 2013). Elle est plus abondante sur les feuilles de petites tailles et les jeunes feuilles (Peeters, 2002). De même, la rugosité de la surface ralentit le déplacement des insectes mais peut s'avérer un bon emplacement de ponte pour d'autres. Les cires à la surface des feuilles les protègent également des attaques de phytophages et des pathogènes (Peeters, 2002, Picoaga et al., 2003). La difficulté d'accès aux vaisseaux conducteurs pour les insectes suceurs est également dissuasive, soit parce que les vaisseaux sont trop éloignés de la surface de la feuille, soit parce qu'ils sont protégés par des tissus sclérifiés (Peeters, 2002). Des tissus durs ou épais peuvent réduire l'accès aux cellules nutritives et décourager les ravageurs comme *N. Fulviceps* sur pin poderosa dont les aiguilles sont les plus dures (Vaissayre et al., 2013) ou *D. micans* sur épicéa dont l'écorce est riches en lignine (Vaissayre et al., 2013). La lignine peut être répartie sur la surface de la feuille ou bien

plutôt agrégée à proximité des vaisseaux conducteurs ou les deux, en fonction des espèces végétales (Peeters, 2002). La lignification permet également de compartimenter davantage d'autres tissus moins protégés et ainsi de freiner la progression du bio-agresseur. La présence de lignine limite la progression des lésions fongiques, ce qui semble un facteur important de résistance aux champignons comme *D. pinea* (Wallis et al., 2009). Il a été démontré que la densité des phytophages augmente sur des feuilles présentant un faible poids proportionnellement à leur surface, caractérisées par de fines lamelles et une cuticule peu épaisse, possédant une densité élevée de petits stomates, des vaisseaux conducteurs lignifiés proches de la surface de la feuille en quantité modérés (Peeters, 2002). C'est donc un ensemble de caractéristiques de défense qui est prise en compte par le phytophage pour évaluer l'acceptabilité de l'hôte.

Mais, au cours de son développement, la morphologie et la composition de la feuille évoluent, ce qui explique qu'elle soit particulièrement plus sensible aux attaques des bio-agresseurs à certains stades phénologiques (Peeters, 2002). Certains bio-agresseurs préfèrent les feuilles matures, plus nutritives, d'autres préfèrent les jeunes feuilles dont les barrières physiques sont moins développées (Peeters, 2002). La dureté et la résistance de la feuille, lorsque son développement est achevé, sont les facteurs prépondérants dans la diminution des attaques de phytophages sur les feuilles matures (Kursar et Coley, 2003, Coley et al., 2006).

Des barrières physiques peuvent également être mises en place ou activées a posteriori. Ainsi, La résistance à *P. viticola* est déclenchée chez les variétés de *vitis* résistantes à ce pathogène, suite au contact d'un premier haustoria avec les cellules du mésophylle (Jürges et al., 2009). Cela se traduit par un dépôt de callose dans les stomates (Gindro et al., 2003, Boubakri et al., 2012) qui empêche la pénétration de l'hyphe à l'intérieur de la feuille. La production de callose est également efficace contre *Erysiphe necator* (Clay et al., 2009) car elle permet de diminuer la croissance mycélienne. Enfin, certaines plantes comme *Solanum berthaultii* stockent des substances gluantes à leur surface qui se libèrent au contact de l'insecte lorsque celui-ci brise le trichome qui les contient. L'insecte est alors définitivement immobilisé (Vaissayre et al., 2013). L'efficacité des barrières physiques dépend de la vigueur de la plante, de son état physiologique et de son âge. Elle est généralement renforcée par des barrières chimiques.

1.3.3.2 Défenses chimiques constitutives

Dans les molécules chimiques constitutives, on distingue les molécules toxiques induisant une modification du comportement ou ayant des effets délétères, des molécules anti-appétence ou dissuasives pour le phytophage. Les molécules de défense constitutives à vocation toxique sont produites puis stockées dans les organes les plus sensibles aux attaques potentielles comme les bourgeons, les fruits, les graines ou les jeunes pousses puis dans une moindre mesure les feuilles. Les toxines pouvant également être dangereuses pour la plante, sont généralement stockées dans des trichomes, des poils ou des conduits lactifères et libérées lorsque les phytophages brisent ces structures (Desneux, 2013). Parfois il s'agit d'enzymes inactives dont l'activateur, situé dans un autre compartiment n'est libéré qu'en cas de lésions. Des composés phénoliques comme le coumarin ou des terpenoïdes constituent le plus souvent ces toxines (Alonso et al., 2009, Mellersh et al., 2002), des glycoalcaloïdes comme la tomatine ou la solamargine, sont aussi synthétisés dans les feuilles des solanacées (Vaissayre et al., 2013), tandis que les Brassicacées libèrent des glucosinolates, des thiocyanates et des nitriles (Gols et al., 2008, Porter et al., 1991) contre les phytophages. De même, la résistance de certains cépages viticoles au champignon *E. necator* provient de leur capacité à produire des substances secondaires anti-microbiennes (Thordal-Christensen, 2003) et du peroxyde d'hydrogène (Boubakri et al., 2012, Mellersh et al., 2002).

Certaines de ces substances ont des effets délétères directs sur les ravageurs en diminuant leur fécondité, en réduisant le taux de survie des larves ou en perturbant leur développement (Francis et al., 2000, Kessler et Baldwin, 2002). Ainsi, le succès d'accouplement chez les mâles et les femelles de *Lobesia botrana* sur vigne diminue sur le cépage Riesling par rapport au Chasselas ou au Gewurztraminer (Moreau et al., 2007). La qualité et la production de phéromones produites par les insectes pourraient dans ce cas être influencée par leur plante hôte (Moreau et al., 2007). Les effets sont souvent plus délétères pour les phytophages généralistes dont la survie diminue à tous les stades (œuf à adulte) que pour les spécialistes pour lesquels seuls le temps de développement puis la masse corporelle adulte sont impactés (figure 20).

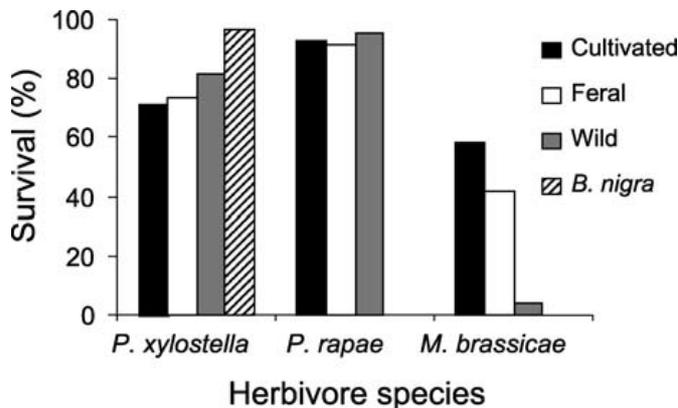


Figure 20: Taux de survie de phytophages spécialistes (*Plutella xylostella* et *Pieris rapae*) et de généraliste (*Mamestra brassicae*) en fonction de l'alimentation sur des brassicacées cultivées ou sauvages (plus riches en glucosinolates) (Gols et al., 2008)

Les toxines peuvent être efficaces contre une ou plusieurs catégories de bio-agresseurs. Par exemple, la coumarine est toxique à la fois pour les bactéries, les champignons, les vertébrés et les invertébrés (Berenbaum 1991 cité par Alonso et al., 2009). Les composés phénoliques et terpéniques améliorent la résistance de la plante aux champignons pathogènes (Wallis et al., 2008) et aux phytophages.

Par ailleurs, les ravageurs peuvent se détourner de plantes dont la qualité nutritive est jugée insuffisante soit à cause de leurs faibles teneurs en acides aminés et en sucre, soit à cause de la présence de composés métaboliques secondaires répulsifs. Ainsi, Les signes d'aversion gustatifs sont souvent dus à des composés amers comme la quinine (Thiéry et al., 2013b). Une teneur importante de certains composés secondaires dans les feuilles dissuade les ravageurs d'attaquer et de fait induit une résistance. Par exemple, les glycoalcaloïdes de la pomme de terre rebutent le doryphore, le taupin et la cicadelle tandis que les composés phénoliques du peuplier dissuadent la chrysomèle, et que les acides résiniques protègent les jeunes aiguilles de pins contre les tenthrèdes (Vaissayre et al., 2013). Les molécules anti-appétence n'ont pas d'effets sur les pathogènes.

L'investissement d'une espèce végétale dans une batteries de molécules défensives est coûteuse, et le gain d'efficacité d'une famille de molécules est souvent contrebalancé par des pertes d'efficacité pour les autres (Wallis et al., 2008). Ces barrières chimiques anti-appétences peuvent parfois être contournées par les insectes, notamment s'il n'y a pas d'autre ressource alimentaire disponible. Cela nécessite au préalable que les insectes se dotent de l'enzyme de détoxification spécifique à la molécule en question ou soient capables de séquestrer cette molécule (Gols et al., 2008, Poelman et al., 2008).

1.3.3.3 Défenses chimiques induites

Les défenses induites peuvent être localisées aux tissus concernés ou systémiques. Elles nécessitent une reconnaissance rapide de l'agresseur par des éliciteurs (protéines, lipides ou protides) grâce à la présence de motifs moléculaires microbiens associés (MAMP) inducteurs portés par le bio-agresseur (Boubakri et al., 2012). Cette reconnaissance résulte de la co-évolution de la plante avec ce bio-agresseur (Ferreira et al., 2007) et permet, d'un part une réaction locale d'hypersensibilité immédiate et d'autre part l'acquisition d'une réponse systémique durable à long terme (Amtmann et al., 2008).

La réaction locale d'hypersensibilité repose sur une production massive et rapide de molécules chimiques vers les tissus situés aux alentours de la zone attaquée afin de stopper la progression des bio-agresseurs. Chez les conifères, il y a la production d'une grande quantité de composés terpéniques toxiques comme le limonène et de composés phénoliques néosynthétisés par les cellules parenchymateuses, associée à une diminution des glucides dans les tissus limitrophes de l'attaque d'insectes foreurs. Les tissus limitrophes de la zone affectée, devenus peu nutritifs ralentissent la progression des bio-agresseurs, tandis que les molécules sécrétées ont des effets antibiose et antixénose sur les ravageurs et les champignons associés. Enfin, la formation d'un bourrelet cicatriciel imperméable isole les tissus sains des tissus attaqués et sacrifiés (Lieutier et al., 2013). Contre les insectes piqueurs suceurs comme les pucerons, la réaction est plus localisée au niveau cellulaire. Elle repose d'une part sur la production de molécules oxydantes qui vont provoquer la mort cellulaire autour du site d'alimentation comme les peroxydases, d'autre part sur la libération de calcium d'origine apoplasmique afin de former des calloses visant à stopper le flux de sève (Lieutier et al., 2013). Une réaction similaire peut également être observée contre les pathogènes (Boubakri et al., 2012, Dietrich et al., 2004). Ainsi, chez les variétés *Vitis* résistantes, un premier contact avec *P. viticola* va entraîner aussitôt la production de molécules antimicrobiennes comme l'inositol ou l'acide caféique (Figueiredo et al., 2008), et la production de composés oxydants (Kortekamp et Zyprian, 2003) visant à stopper la croissance du pathogène (Boubakri et al., 2012). Lorsque la présence d'un champignon pathogène est détectée par la plante, elle active des enzymes constitutives visant à détruire son agresseur comme la chitinase qui peut hydrolyser les chitines, la chitosanase qui lysent les spores fongiques, et comme la peroxydase qui provoquent la mort cellulaire afin de circonscrire le pathogène (Grenier et Asselin, 1990). Les vitamines comme la thiamine peuvent induire cette cascade de réaction localisée avec à la fois la production de callose, de molécules oxydatives et de composés phénoliques contre *P. viticola* chez la vigne (Boubakri et al., 2012).

La réaction systémique est basée sur la production de protéines de défenses suite à l'activation des voies jasmoniques, salicyliques ou de l'éthylène. La voie salicylique est requise pour une réponse contre les virus, les bactéries et les champignons biotrophes, tandis que la voie jasmonique est plutôt sollicitée contre les champignons et les insectes phytophages (Bart et al., 1998, Glazebrook, 2005, Thomma et al., 1998 cité par Amtmann et al., 2008) et la voie d'éthylène contre les nécrotrophes (Boubakri et al., 2012). Il existe des interactions complexes comme l'hormono-dépendance entre ces différentes voies encore mal connues (Truman et al., 2007, Bart et al., 1998). La réaction systémique nécessite une reconnaissance préalable du phytophage ou du pathogène grâce à l'activation de site de reconnaissance de composés salivaires pour les insectes ou de récepteurs pathogènes spécifiques. La réaction systémique vise soit à diminuer l'attaque immédiate soit celles des générations futures. Par exemple, lors d'attaques de défoliateurs sur bouleau *Betula pubescens* ou sur chêne *Quercus velutina*, il y a production de tannins et de composés phénoliques vers les feuilles tout en diminuant leur teneur en glucides, en protéines et en eau. De fait la digestibilité et la qualité

nutritive des feuilles diminuent pour les défoliateurs mais perturbe également la croissance, le développement et la survie de leurs larves (Baldwin et Karban, 1997, Lieutier et al., 2013). La stimulation des voies jasmoniques chez la vigne, entraîne la production de stilbènes, qui rendent la plante plus tolérante de 73% aux attaques d'oïdium suivantes (Belhadj et al., 2006).

Emission de molécules volatiles

Une autre stratégie de défense consiste à recruter des auxiliaires afin de contrôler la déprédation. Ce recrutement se fait à distance grâce à l'émission de molécules volatiles.

Les composés volatils émis par les plantes jouent un rôle prépondérant dans les interactions plantes-insectes à distance, c'est pourquoi ils sont particulièrement étudiés. Actuellement 1700 molécules (dont 1000 en réponse à l'attaque d'un phytophage) ont été identifiées pour près de 1000 espèces végétales (Thiéry et al., 2013a). Certaines plantes émettent jusqu'à une centaine de molécules volatiles différentes. Les molécules volatiles émises par la plante et impliquées dans les interactions plantes-autres organismes sont appartenent à trois groupes : les kairomones utilisées par les phytophages pour localiser leur plante-hôte, les allomones ayant une action répulsive vis à vis des ravageurs, enfin les synomones émises par la plante pour attirer les pollinisateurs ou les prédateurs et les parasitoïdes des bio-agresseurs en cas d'attaque (Khan et al., 1997, Schaller, 2008). Ce sont le plus souvent des terpènes, des composés aromatiques ou des dérivés d'acides gras issus des métabolites secondaires (Dudareva et al., 2004) généralement diffusés par les stomates ouverts ou exsudés par les tissus lésés. Une molécule émise par une plante peut être une allomone pour un organisme et une kairomone pour un autre. Par exemple, les glucosinolates produites par les brassicacées sont dissuasives pour les phytophages généralistes alors qu'elles attirent les phytophages spécialistes (Francis et al., 2000, Alonso et al., 2009). Certains parasitoïdes sont particulièrement sensibles aux molécules émises par les parties lésées de la plante sous l'action d'un phytophage (Thiéry et al., 2013a). Dans ce cas, afin d'attirer le plus d'ennemis naturels possibles, la plante émet ses molécules attractives pas seulement au niveau de l'organe lésé mais à l'échelle de la plante entière (Turlings et Wackers, 2004). Les composés volatils émis informent précisément les entomophages de l'identité des ravageurs, leur nombre et leurs stades de développement et les renseignent aussi sur l'identité de la plante hôte. Cela nécessite au préalable une reconnaissance du phytophage par la plante qui repose sur des composés salivaire spécifiques du phytophage (Lieutier et al., 2013). Une cascade enzymatique conduit alors à l'activation d'une des trois voies de défense systémique puis à la production de composés volatils spécifiques, parfois depuis des organes éloignés de la zone lésée (Lieutier et al., 2013).

Les facteurs environnementaux peuvent influencer l'émission de ces molécules, et d'une manière plus générale les mécanismes de défense : la température, l'hygrométrie, la luminosité ou le stress hydrique peuvent limiter l'ouverture des stomates tandis que le type de sol favorise ou non leur production (par exemple, la lavande est odorante sur sol calcaire mais pas sur sols argileux). De même que les facteurs biotiques comme la prédisposition génétique, la variété, le stade phénologique de la plante ou son état physiologique peuvent également conditionner la nature et la quantité de molécules produites (Vaissayre et al., 2013).

Dans certains cas, les ravageurs comme *Grammia geneura* ou *Brevicoryne brassicae* ont détourné les stratégies de défense des plantes à leur profit : ils peuvent séquestrer les molécules toxiques produites par les plantes au sein de leur propre organisme bien que cela ralentisse leur propre développement, ce qui leur confère une résistance à l'attaque de parasitoïdes (Singer et al., 2004) ou des prédateurs (Francis et al., 2000, Coley et al., 2006).

Ainsi, les phytophages nourris sur des feuilles plus riches en métabolites secondaires de défense (feuilles matures > jeunes feuilles à croissance lente > jeunes feuilles à croissance rapide) sont moins consommées par les prédateurs (figure 21).

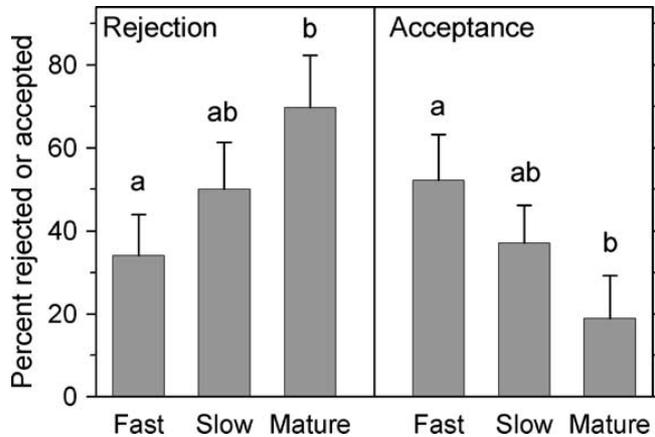


Figure 21: Rejet (rejection) ou l'acceptation (acceptance) du phytophage *Ectatomma ruidum* par ses prédateurs en fonction de son alimentation sur jeunes feuilles à croissance rapide (fast), jeunes feuilles à croissance lente (slow) et feuilles âgées (matures) (Coley et al., 2006)

Dans le cas où les prédateurs consommeraient quand même ces ravageurs, leur développement et leur reproduction sont affectés par la présence de ces molécules toxiques (Francis et al., 2000). Les effets délétères sur les prédateurs fluctuent en fonction de la plante consommée par le phytophage : *Brevicoryne Brassicae* sera plus toxique pour les Coccinellidae si elle s'est nourrie préalablement sur *Sinapis alba*, qui produit plus de glucosinolates que sur *Brassica napus* (Francis et al., 2000).

Néanmoins, on remarquera que ces effets peuvent être modulés en fonction du niveau de spécialisation du prédateur ou du parasitoïde comme dans le cas présenté (figure 22).

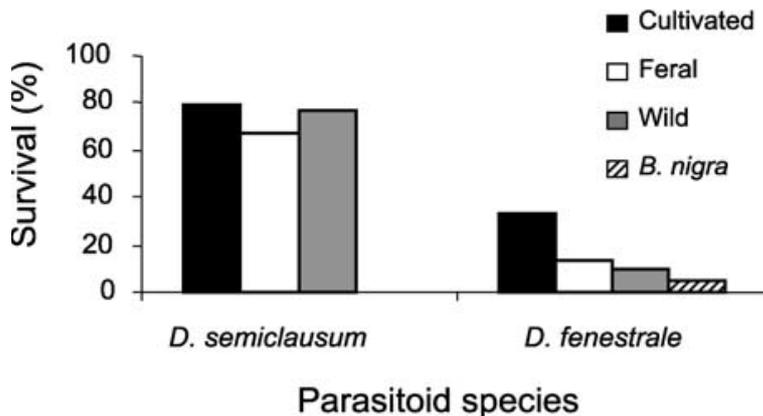


Figure 22: Comparaison du taux de survie d'un parasitoïde spécialiste *Diadegma semiclausum* et d'un parasitoïde généraliste *Diadegma fenestrale* en fonction de l'alimentation de leur proie sur des brassicacées plus ou moins cultivées (Gols et al., 2008)

Ainsi, le taux de survie est plus faible pour un parasitoïde généraliste comme *Diadegma fenestrale* qui s'est développé sur des proies nourries sur des plantes sauvages, plus riches en glucosinolates que sur les espèces cultivées, moins riches en toxines. Tandis que le taux de survie du parasitoïde spécialiste *Diadegma semiclausum* est peu impacté dans les mêmes

conditions (Gols et al., 2008). Une étude similaire réalisée sur différents cultivars montrent que les choix des cultivars varient en fonction du phytophage et n'est pas toujours corrélée à la teneur en glucosinates. Ce qui suppose que les phytophages ont des sensibilités variables aux glucosinates mais également à d'autres molécules secondaires et sont sensibles à la différence de qualité des nutriments (Poelman et al., 2008). La sélection variétale et les conditions de culture modifient donc la biologie des plantes, ce qui influence leurs relations avec leurs bio-agresseurs.

1.3.4 Facteurs anthropiques influençant les interactions plantes-bio-agresseurs

L'équilibre plante hôte- bio-agresseur peut être rompu par exemple lorsque la ressource végétale diminue, que la population de bio-agresseur n'est plus régulée ou que les réseaux trophiques ne fonctionnent plus. L'action de l'homme entraîne souvent des perturbations de cet équilibre notamment par l'utilisation d'intrants dans les cultures.

Impact des pesticides sur les interactions entre la plante et les bio-agresseurs

L'usage de pesticides perturbe cet équilibre en sélectionnant les populations de ravageurs résistantes au pesticide utilisé, en éliminant les auxiliaires de culture et les ennemis naturels des ravageurs ou en perturbant leur action, et enfin en induisant des effets secondaires sur la plante.

Au départ, l'usage d'un pesticide provoque une mortalité rapide à grande échelle d'un ravageur. Or les individus qui survivent sont ceux dont le génotype leur a permis de résister au pesticide et qui seront de fait à l'origine de nouvelles générations moins sensibles au produit utilisé (Hardin, 1995). De plus, l'élimination d'une catégorie d'herbivores permet de libérer une niche écologique qui peut être rapidement colonisée par un autre ravageur.

L'usage d'insecticide contre les ravageurs peut décimer également les prédateurs ou les parasitoïdes (Hassler, 1990) de ce ravageur, surtout si ce sont des spécialistes. Dans ce cas, la diminution du nombre de proies disponibles entraîne une diminution du nombre de prédateurs (Ehler, 1989 cité par Hardin, 1995) ou leur dispersion. Ils peuvent également être empoisonnés par contact avec une proie traitée (Hardin, 1995). Leur détection olfactive des proies peut être perturbée/masquée par l'insecticide. L'émission de molécules volatiles par les plantes pour attirer les prédateurs, peut également être altérée par les matières actives ou les adjuvants entrant dans la composition des pesticides (Juniper et Southwood, 1986).

Dans certains cas, le pesticide peut induire un effet non-intentionnel secondaire contraire aux objectifs. Par exemple, l'usage de certains insecticides comme le decaméthrine ou le perméthrine, entraînent des effets secondaires sur les plantes elles-mêmes comme une diminution du ratio C : N ou une augmentation des acides aminés libres (Buenaflor et al., 1981). La valeur nutritive de la plante s'en trouve modifiée et peut la rendre encore plus attractive pour les ravageurs ou bien améliorer le fitness des larves herbivores (Chelliah et Heinrichs, 1984, Johns et Parella, 1984). Les retombées des pesticides sur le sol modifient également les communautés de microorganismes du sol, ce qui peut perturber le fonctionnement du sol et donc l'alimentation puis le métabolisme de la plante.

Importance de la fertilisation

Une bonne fertilisation améliore la croissance de la plante et augmente sa valeur nutritive, ce qui la rend aussi parfois plus attractive pour les bio-agresseurs qui préfèrent les plantes vigoureuses (Chelliah et Heinrichs, 1980). En effet, une plante présentant une meilleure

qualité nutritive augmente la survie du ravageur (Kaspi et al., 2002), sa fécondité et sa taille adulte (Awmack et Leather, 2002). La synchronisation de certains insectes phytophages spécialistes avec des stades phénologiques précis leur permet par exemple d'optimiser leur fécondité en fonction de la teneur en azote dans les feuilles (Awmack et Leather, 2002), et de caler l'éclosion des larves lorsque les feuilles sont particulièrement riches en azote. De plus une plante de bonne qualité nutritive, riche en protéines, induit une meilleure défense des phytophages contre leurs ennemis naturels par une augmentation de leur activité antimicrobienne et une meilleure encapsulation des parasitoïdes chez les phytophages qui la consomme (Lee et al., 2008, Diamond et Kingsolver, 2011). Ce n'est toutefois pas le cas chez tous les insectes, et en particulier chez *Scaphoideus titanus* un de nos modèles d'étude, les différences qualitatives de phloème ne permettent pas d'expliquer des taux de croissance différentielle des larves (Chuche et al, 2014 in press BER).

Par ailleurs, une croissance rapide de la plante grâce à la fertilisation, sollicite davantage le métabolisme primaire ce qui se fait au détriment du métabolisme secondaire dont dépendent principalement les systèmes de défense des plantes. Les plantes fertilisées présentent parfois une diminution de la teneur en métabolites secondaires de défense, comme c'est le cas pour les glucosinolates, chez les crucifères (Chen et al., 2004), c'est pourquoi elles attirent préférentiellement les ravageurs. Une variation dans la disponibilité des nutriments comme l'azote entraîne aussi une diminution des quantités de glycoalcaloïdes, de terpènes et de composés phénoliques produits par la plante (Wallis et al., 2009). La concentration en lignine décroît significativement avec l'augmentation de la disponibilité en azote (Wallis et al., 2009). Par contre, la plante produit davantage de protéines solubles, dont les enzymes impliquées dans la résistance aux attaques de pathogènes comme la chitinase, la chitosanase et la peroxydase et la réponse aux éliciteurs est donc plus rapide (Dietrich et al., 2004).

Lorsque le développement des feuilles est ralenti, leurs concentrations en azote est proportionnellement plus faible et celle en métabolites secondaires de défense plus élevée (Mooney et Gulmon, 1982, Kursar et Coley, 2003), ce qui rend la plante moins attractive notamment pour les insectes généralistes. Toutefois, le comportement des spécialistes est souvent peu modifié du fait de leur meilleure adaptation aux métabolites secondaires de défense d'une espèce de plante en particulier, résultant de leur coévolution (Francis et al., 2000). Ainsi, si le développement de *Prokelisia dolus* est peu impacté c'est parce qu'il investit davantage dans la croissance musculaire et une meilleur efficacité d'ingestion des nutriments car c'est un sédentaire. Au contraire, *Prokelisia marginata* a tendance à se disperser pour trouver une ressource alimentaire plus adéquate, car s'il n'accède pas rapidement à une meilleure ressource son développement sera fortement impacté (Huberty et al., 2006). L'impact de la fertilisation de la plante est également observable sur le développement des pathogènes biotrophes. Ainsi, une expérimentation menée sur des tomates montre que la période de latence de *Botrytis cinerea* augmente sur des plantes fertilisées avec une teneur en azote élevée dans les feuilles. Au contraire, un déficit en azote entraîne une diminution des teneurs en acides aminés tels que l'acide glutamique et la glutamine qui sont les principales sources d'azote pour le champignon, ce qui pourrait mener plus rapidement à sa sporulation (Lecompte et al., 2010).

Si la fertilisation azotée de la plante peut favoriser la production de protéines de défense de la plante contre l'infection par les pathogènes (Dietrich et al., 2004) et permet de diminuer la sévérité de maladies (Lecompte et al. 2010), cela ne compense pas pour autant l'effet du microclimat, crée par l'accroissement de la surface des feuilles, qui reste favorable à l'infection par ces mêmes champignons pathogènes (R'Houma et al., 1998). Ainsi, l'amélioration de l'alimentation azotée de la plante favorise sa sensibilité aux pathogènes

biotrophes car le gain en qualité nutritive, notamment acides aminés, leur est également favorable tandis que cela dessert les pathogènes nécrotrophes qui sont confrontés surtout à un meilleur système de défense de la plante (Lecompte et al., 2010).

Une bonne alimentation de la plante en potassium est également indispensable au maintien des défenses naturelles de la plante puisqu'une carence en K augmente la sensibilité de la plante aux bio-agresseurs (figure 23).

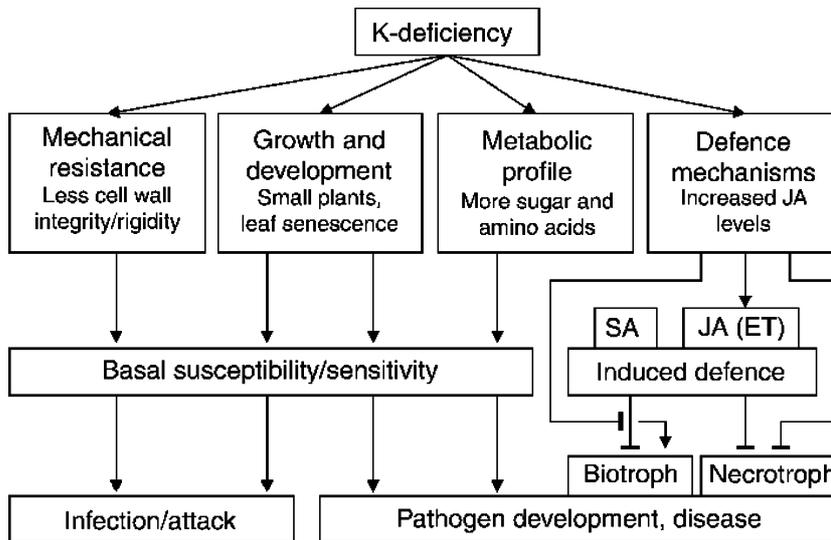


Figure 23: Effets potentiels de carence en K sur la sensibilité de la plante aux bio-agresseurs (Ammann et al., 2008)

Ainsi, 63 % des attaques de ravageurs et 69% des maladies fongiques et bactériennes diminuent sur des plantes recevant des apports en potassium (Ammann et al., 2008). A contrario, les attaques virales progressent de 52% (Ammann et al., 2008). Comme le potassium permet de réguler des activités enzymatiques du métabolisme primaire comme la synthèse, une carence en K entraîne une augmentation des sucres solubles et de certains acides aminés dans la plante (Smith et al., 2000, Marschner, 1995, Ammann et al., 2008), ce qui constitue une ressource nutritive attractive pour les bio-agresseurs comme le puceron (Walter et Difonzo., 2007). De plus, lors d'une déficience en k, les gènes marqueurs de la voie de défense jasmoniques sont surexprimés (Ammann et al., 2008).

Influence de l'alimentation hydrique

La capacité de tolérance à la sécheresse d'une plante peut se traduire soit par un meilleur ajustement de ses besoins à la ressource en eau ce qui entraînera une croissance plus lente de la plante mais garantira sa survie, soit par le développement d'un métabolisme plus performant qui lui permettra de maintenir sa croissance mais présentera un coût énergétique plus élevé. En cas de stress hydrique, on observe le plus souvent, un ralentissement de la croissance et de la vigueur, ce qui induit une diminution de la ressource végétale pour les bio-agresseurs. Il peut en résulter une diminution du nombre de phytophages spécialistes (Teder et Tammaru, 2002). En outre, il n'est pas toujours aisé de distinguer les mécanismes visant à diminuer le stress hydrique, de ceux visant à réduire l'attaque des bio-agresseurs puisque dans certains cas ce sont les mêmes processus qui entrent en jeu : Par exemple pour lutter contre le stress hydrique, les espèces végétales vont chercher à diminuer les pertes en eau en augmentant l'épaisseur des cuticules et des cires, en fermant davantage les stomates, ou en

limitant la taille des feuilles. Or ce sont des barrières physiques qui sont également utilisé habituellement contre les bio-agresseurs. De fait, l'impact direct des modifications de la plante engendrée par le stress hydrique, sur les interactions avec les bio-agresseurs a été trop peu étudié. Toutefois, une expérimentation comparant la tolérance aux attaques de *P. xylostella* de deux espèces de *Boecheira* (Brassicacées) plus ou moins tolérantes à la sécheresse a été menée par Haugen et al. (2007): les plantes présentant une meilleure résistance à la sécheresse avec diminution de leur croissance pour gérer plus efficacement leur besoin en eau sont également plus résistantes aux herbivores comme si leur niveau de défense devenait plus élevé ou plus concentré. Tandis que dans le cas de plantes sensible à la sécheresse et soumises à un stress hydrique, présentant un taux de transpiration plus faible, on observe une diminution de ces mécanismes de défenses face aux herbivores. Il semblerait donc que ce soit plus un effet de concentration/dilution des substances secondaires de défense qu'une modification du métabolisme secondaire a proprement parlé, qui modifie le comportement des bio-agresseurs.

Influence de l'alimentation en oligo-éléments

Celle ci a été particulièrement étudiée pour le fer, dont la carence plus courante est préjudiciable à la plante. Une expérience a été effectuée pour mesurer l'impact du fer sur le développement de pathogènes endophytes de la vigne et il semblerait qu'un milieu enrichi en fer soit également bénéfiques aux microorganismes dont les champignons pathogènes : l'expérimentation réalisée in vitro sur des milieux enrichis en fer montre que la dégradation de toute la cellulose (dont la cellulose cristalline) est possible par deux champignons de l'esca (*Phaeoconiella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum*) alors qu'en temps normal, seule la cellulose non cristalline est dégradée. Le fer qui a été ajouté dans le milieu forme des composés hydroxyles qui compensent le manque d'activité enzymatique spécifique des champignons (Osti et Di Marco, 2010). Ainsi, les radicaux OH libérés, participent alors à la détoxification des polymères de bois, y compris les polyphénols qui protège le bois de vigne des maladies (Larson, 1988), ce qui facilite la pénétration du champignon. On a donc un processus fer-dépendant de nature non enzymatique, qui favorise le développement des pathogènes, sans perturber les autres activités enzymatiques des champignons (Osti et Di Marco, 2010). Les pathogènes sont donc sensibles à la disponibilité en oligo-éléments, nécessaires à leur développement.

On a donc un tryptique plante-bio-agresseurs-environnement particulièrement imbriqué dans le fonctionnement de l'écosystème cultivé. Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à la vigne, à ses conditions culturale et son cortège de bio-agresseurs. Les niveaux trophiques supérieurs (ennemis naturels des bio-agresseurs) sont eux aussi impliqués dans ces relations trophiques, mais ne seront pas traités dans cette thèse.

1.4 Bio-agresseurs de la vigne

La biodiversité, la densité de population des bio-agresseurs de la vigne ainsi que leur agressivité fluctuent en fonction du climat et de la latitude de la zone de production mais aussi du cépage ou de l'espèce *Vitis* cultivé. Les bio-agresseurs (tableau 6) peuvent être localisés sur différentes parties de la vigne (grappes, feuilles, troncs, racines) ou circuler dans la sève dans le cas de bactéries, virus ou phytoplasmes.

Tableau 6: Principaux bio-agresseurs de la vigne

Bio-agresseur	Organes cibles	Nuisibilité majeure	Problématique de lutte
---------------	----------------	---------------------	------------------------

oomycète	Mildiou (<i>Plasmopara viticola</i>)	Organes herbacés	Impact quantitatif et qualitatif	Forte consommation de pesticides (40% des IFT)
champignon	Oïdium (<i>Erysiphe necator</i>)	Organes herbacés	Forte dynamique épidémique	Résistance aux fongicides
champignon	Dépérissement due à <i>Botryosphaeria sp.</i>	Bois	Vignoble improductif	Maladie mal connue, absence de lutte efficace
champignon	Eutypiose (<i>Eutypa lata</i>) Esca (<i>Phaeomoniella chlamydospora...</i>)	Organes aériens	Vignoble improductif	Absence de lutte efficace
champignon	Black rot (<i>Guignardia bidwellii</i>)	Organes aériens	Impact quantitatif et qualitatif	
champignon	Pourriture grise (<i>Botrytis cinerea</i>)	Organes herbacés	Impact qualitatif	Difficulté de prévisions des risques
insecte	Tordeuses (<i>Lobesia botrana</i> , <i>Eupoecilia ambiguella</i> et <i>Sparganothis pilleriana</i>)	grappes	Impact quantitatif, favorise la pourriture grise	Contrôler avant la pénétration des chenilles dans le fruit
insecte	Cicadelle de la flavescence dorée (<i>Scaphoideus titanus</i>)	Feuilles, pampres	Vecteur du phytoplasme de la Flavescence dorée	Lutte obligatoire
insecte	Drosophile (<i>drosophila melanogaster</i> , <i>drosophila simulans</i>)	grappes	Vecteurs des levures responsables de la pourriture acide	Difficulté de prévisions des risques
insecte	Cicadelle vectrice du bois noir (<i>Hyalestes obsoletus</i>)		Vecteur du phytoplasme du Stolbur-bois noir	Difficulté de prévisions des risques
insecte	Phylloxera (<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>)	Racines	Mort des ceps	Greffage

Nous nous limiterons ici à la description des trois bio-agresseurs sur lesquels nous avons travaillé durant cette thèse *S. titanus*, *P. viticola* et *Botriosphaeria sp.* Ils se développent ou vivent dans la partie épigée de la plante et plus particulièrement au niveau des feuilles et du tronc.

1.4.1 La Cicadelle de la Flavescence dorée *Scaphoideus titanus*

La Cicadelle de la Flavescence dorée, (*Scaphoideus titanus*) n'est pas un ravageur direct de la vigne. En effet, cet insecte phytophage appartenant à la famille des cicadellidae de l'ordre des hémiptères, se nourrit de sève au stade larvaire et adulte, mais provoque peu de dégâts directs par pique. Par contre, c'est le vecteur du phytoplasme responsable de la maladie de la Flavescence dorée. Originnaire d'Amérique du Nord, cette cicadelle a été importée accidentellement en France au siècle dernier puis s'est répandue dans le sud de l'Europe.

1.4.1.1 Flavescence dorée

Il existe plusieurs phytoplasmes qui s'attaquent à la vigne, responsables des jaunisses de la vigne (Belli et al., 2010). La flavescence dorée est la jaunisse de la vigne pouvant être véhiculée par *S. titanus* (Angelini et al., 2003). On distingue trois groupes de souches de phytoplasmes de la flavescence dorée *Candidatus Phytoplasma vitis* FD1, FD2 et FD3 (Arnaud et al., 2007). La sensibilité à la maladie varie en fonction des cépages : par exemple, le Cabernet Sauvignon, le Baco 22 y sont très sensibles, le Merlot ou le Pinot Noir sensibles tandis que le Chasselas ou le Villard Couderc13 y sont peu sensibles (Chuche et Thiéry, 2014). Les porte-greffes américains présentent peu de symptômes de la maladie mais peuvent être des porteurs sains (Caudwell et al., 1994). Les cépages les plus sensibles sont également ceux qui sont les plus fréquentés par *S. titanus* (Chuche et Thiéry, 2014).

Une fois dans la plante, le phytoplasme circule dans le phloème vers les autres parties aériennes où il se multiplie puis jusqu'aux racines où il passe l'hiver. La multiplication du phytoplasme est plus rapide pour des températures proches de 25°C (Salar et al., 2012). L'été et le printemps suivants, il migre via le phloème vers les jeunes parties aériennes, généralement au niveau du phloème des feuilles ou des jeunes tiges (McCoy et al., 1989) car il a besoin d'insectes vecteurs qui se nourrissent de sève élaborée pour se transmettre d'un hôte à l'autre. Comme, les symptômes de la maladie ne s'expriment au mieux que l'année suivante de l'inoculation du cep, un cep peut donc servir d'inoculum pour la propagation du phytoplasme avant que la maladie ne soit diagnostiquée (Chuche, 2010).

Les premiers symptômes de la flavescence dorée sur vigne apparaissent fin mai–début juin de l'année suivante de l'inoculation : le débourrement est plus tardif puis la croissance est ralentie, les feuilles s'enroulent et deviennent rigides, les nervures prennent une teinte jaune crème, les entre-nœuds se raccourcissent, la vigne prend un port pleureur (Caudwell, 1964). En été, les inflorescences se dessèchent complètement, les rameaux restent mous et caoutchouteux et il n'y a pas d'aoûtement. Les feuilles rougissent pour les cépages rouges (figure 24A) ou jaunissent pour les cépages blancs (figure 24B), le changement de couleur est plus variable pour les hybrides.

L'atteinte des vaisseaux conducteurs perturbe la photosynthèse et le transport des nutriments d'où une baisse de rendement jusqu'à 50% et une diminution de la qualité des baies qui sont alors plus acides, plus amères et plus pauvres en sucres (Chuche, 2010). Les baies peuvent également être affectée et se dessécher (figure 24C). Parfois seuls quelques rameaux sont touchés (figure 24D), parfois c'est le cep en entier (Bressan et al., 2005). Les symptômes sont plus sévères en cas de stress hydrique ou d'un fort ensoleillement (Caudwell, 1964) puisque la circulation de la sève est perturbée. Mais, même si les symptômes de la maladie ne s'expriment pas tous les ans, le phytoplasme reste présent à vie dans la plante, qui devient source d'inoculum pour les ceps sains alentours. A plus ou moins long terme, lorsque le cep est âgé et en fonction de la sensibilité du cépage, la souche infestée meurt.

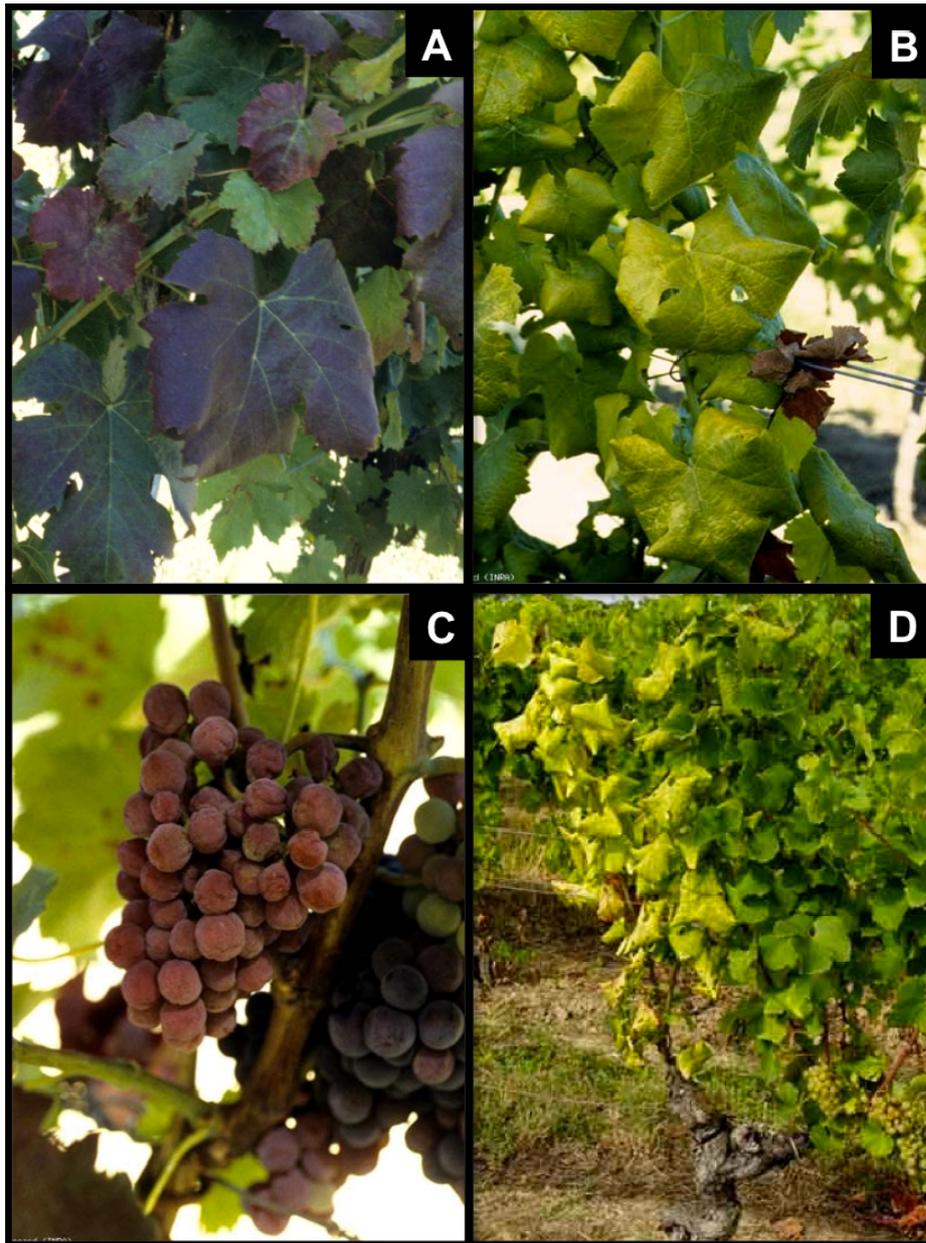


Figure 24: Symptômes de la flavescence dorée sur sur (A) feuilles de cépage rouge, (B) feuilles de cépage blanc, (C) grappe et (D) cep entier dont un seul bras est touché (ephytia, INRA).

La flavescence dorée a été déclarée organisme de quarantaine par l'Union Européenne en 1993 (Directive 92/103) et la lutte rendue obligatoire en France par l'arrêté ministériel du 9 juillet 2003. □ Comme il n'existe pas de traitement curatif contre cette maladie, les pieds atteints sont arrachés et des traitements insecticides contre la cicadelle vectrice *S. titanus* sont effectués afin de limiter la propagation de la maladie.

1.4.1.2 Biologie et cycle de développement de *S. titanus*, insecte vecteur de la Flavescence dorée

Cet insecte, originaire d'Amérique du Nord (Papura et al., 2012), a été introduit accidentellement dans le sud de la France et observé pour la première fois dans les années 50 (Bonfils et Schvester, 1962). On soupçonne toutefois une introduction beaucoup plus précoce. Aujourd'hui, environ la moitié des communes viticoles françaises est colonisée par cette

cicadelle dont l'aire de répartition s'est étendue jusqu'à la Russie (Belli et al., 2010). Cette extension rapide de l'aire de répartition est surtout d'origine anthropique, favorisée par le commerce de boutures viticoles (Papura et al., 2009).

En Amérique du Nord, d'où il est originaire, *S. titanus* est présent à la fois sur l'orme *Ulmus americana* (Gibson, 1973) et sur plusieurs *vitaceae* sauvages, particulièrement sur *V. riparia* et *V. labrusca* (Maixner et al. 1993). En Europe, on le trouve plus particulièrement sur *V. vinifera*, mais également sur *V. labrusca* ou *P. quinquefolia* (Chuche, 2010). Il existe également des différences de fréquentation entre les cépages : *S. Titanus* préfère le Baco 22 ou le Malvoisie de Corse au Villard blanc, au 13 Couderc ou au grenache (Schvester, 1962).

L'éclosion des œufs de *S. titanus* est synchronisée avec l'apparition de jeunes feuilles de vigne particulièrement riches en azote (Mooney et Gulmon, 1982). Elle débute généralement en mai et se prolongent sur plusieurs semaines. Cinq stades larvaires sont nécessaires pour atteindre la forme adulte ailée, en 40-55 jours environ (figure 25A).

Chaque stade dure une environ dizaine de jours, selon la température. De couleur blanche aux 2 premiers stades, les larves passent progressivement au jaune avec une pigmentation brune sur l'abdomen puis le thorax. Les 2 points noirs situés à l'extrémité de l'abdomen sont caractéristiques de cette cicadelle (figure 25B et C). Il y a 4 stades aptères, et le dernier se caractérise par l'apparition d'ébauches d'ailes. Les larves ne peuvent donc se déplacer qu'en sautant d'un étage foliaire à l'autre ou d'un cep à l'autre.

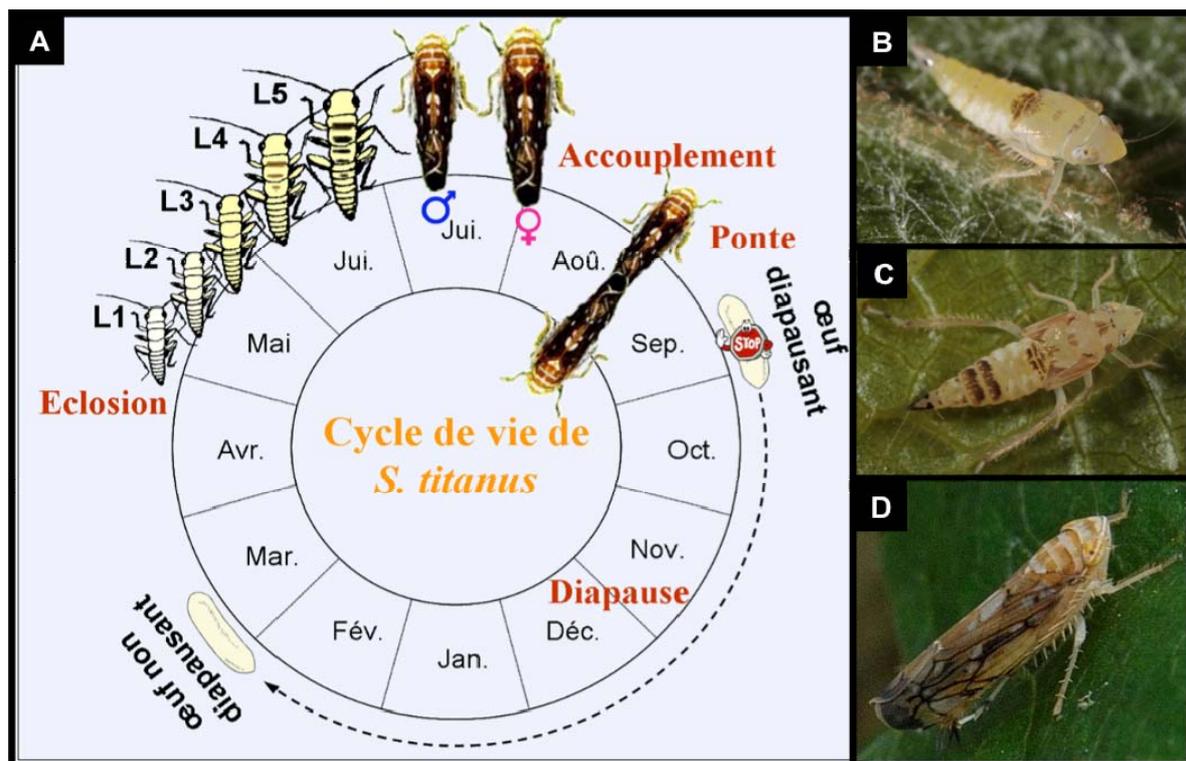


Figure 25: (A) Cycle biologique annuel de *S. titanus* (Chuche, 2010) (B) et (C) larves de *S. titanus* au stade L3 et L5 et (D) cicadelle adulte de la flavescence dorée (ephytia, INRA).

Les premiers adultes apparaissent à partir de la mi-juillet et disparaissent en septembre après l'accouplement puis la ponte. Les adultes vivent environ 1 mois (Schvester, 1962), mesurent entre 4,8 et 5,8 mm, de forme allongée, de couleurs ocre, tachetés de marbrures brunes (figure 25D). Les mâles sont plus petits que les femelles (Schvester, 1962), ont une vie plus courte et émergent en début de saison (Bressan et al., 2005). *S. titanus* se déplace plutôt au crépuscule

lorsque les conditions atmosphériques sont plus favorables au vol (Lessio et Alma, 2006) : Une température journalière proche de 22°C favorise le déplacement (Chuche et Thiéry, 2014) tandis qu'une humidité relative élevée le freine (Lessio et Alma, 2004). *Scaphoideus titanus* se disperse activement dans un rayon de 25-30 m (Lessio et Alma, 2004) ou sur plusieurs kilomètres mais de façon plus aléatoire s'il est porté par le vent (Steffek et al., 2007). Lorsqu'il vole, *S. titanus* choisit sa plante hôte en fonction de l'architecture de la canopée (Lessio et Alma, 2004). Ce sont surtout les mâles qui se déplacent, tandis que les femelles s'éloignent peu de leur plante hôte (Riolo et al., 2014).

Les mâles émettent des signaux vibratoires pour attirer les femelles à la tombée de la nuit. Ils peuvent s'accoupler plusieurs fois tandis que la femelle ne s'accouplera qu'une seule fois (Mazzonni et al., 2009). À la fin de l'été, les femelles pondent des groupes de 10-15 œufs (Chuche et Thiéry, 2014) sous l'écorce de rameaux de vigne âgés de plus de deux ans (Bressan et al., 2005). L'œuf clair, de 1 mm, est allongé et aplati. Les œufs constituent la forme hivernante. La levée de la diapause nécessite un hiver froid, ce qui explique que l'aire géographique de *S. titanus* progresse plutôt vers le nord et l'est de l'Europe (Chuche et Thiéry, 2009). Il n'y a qu'une génération par an mais étalée dans le temps puisque les éclosions des œufs, au printemps suivant, s'étalent sur deux mois environ en fonction des régions (Caudwell et Larrue, 1986).

Les larves se nourrissent de la sève qu'elles prélèvent sur les feuilles et les pampres de la plante où elles ont éclos (Schvester, 1962). Elles se nourrissent surtout sur les petites nervures des limbes alors que les adultes se nourrissent plutôt sur les grosses nervures et les pétioles (Chuche et Thiéry, 2014). On les trouve généralement sur les feuilles les plus abritées mais également sur l'apex lorsque les conditions climatiques le permettent. En effet, si la quantité d'azote présente dans les feuilles est quasiment la même dans les jeunes et vieilles feuilles, par contre la composition en acides aminés varie : les acides aminés essentiels comme l'isoleucine, la leucine et la phénylalanine, présents dans les jeunes feuilles tendent à disparaître chez les vieilles feuilles (Chuche, 2010), c'est pourquoi elles sont davantage fréquentées lorsque les conditions climatiques le permettent. L'insecte perfore l'épiderme entre deux cellules puis dirige ses stylets vers les vaisseaux conducteurs en évitant les plaques de sclérenchymes. Il peut alors se nourrir soit dans les cellules parenchymateuses (20%), soit dans le phloème (40%), soit enfin dans le xylème (Chuche et Thiéry, 2014) puisque sa constitution le lui permet également.

Relation phytoplasme/cicadelle

La cicadelle acquière les phytoplasmes par ingestion lors de la piqûre sur un cep déjà atteint. Les phytoplasmes n'étant présent que dans le phloème, il faut donc que la larve ou l'adulte s'alimente dans le phloème pour se contaminer. S'il peut théoriquement être acquis à tous les stades larvaires et adultes, le phytoplasme n'est le plus souvent acquis par le vecteur qu'à partir du stade larvaire L3 (Bressan et al., 2005a). Le phytoplasme se réfugie dans l'intestin de son hôte où il se reproduit, migre dans l'hémolymphe puis dans les glandes salivaires, où la multiplication est très importante (Boudon-Padieu, 2000). La durée du trajet à l'intérieur de l'insecte est de 1 mois environ (Bressan et al., 2005a). Ce trajet constitue la période d'incubation pendant laquelle la cicadelle ne peut pas transmettre le phytoplasme (Beanland et al., 1999). A la suite de cette période de latence, il existe un risque de contamination d'une nouvelle plante à chaque pique lors de l'alimentation, l'insecte restant vecteur du phytoplasme à vie (Christensen et al., 2005). Par contre, il n'y a pas de transmission à la descendance et tous les œufs pondus sont sains (Bressan et al., 2005b). Cette acquisition du

phytoplasme par *S. titanus* dessert ce dernier puisque cela provoque une diminution de sa durée de vie, de son taux de fécondation et du nombre d'œufs viables (Bressan et al., 2005b).

1.4.2 Le mildiou de la vigne *Plasmopara viticola*

Cet oomycète, proche taxonomiquement des algues brunes, appartient à la famille des Péronosporacées de l'ordre des Péronosporales (Gessler et al., 2011). C'est un biotrophe endophyte, inféodé à la vigne, qui est responsable de la maladie du mildiou de la vigne.

Originaire du nord-est des Etats-Unis, il a été introduit accidentellement en France en 1878 lors d'importations de porte-greffes américains utilisés pour lutter contre le phylloxera. Il s'est ensuite rapidement propagé en Europe d'ouest en est (dès 1881), puis en Afrique, en Amérique du sud et enfin en Australie en 1990 (MacKirby et al., 1999). Il semble que ce soit une petite population d'isolats de la même espèce de *P. viticola* qui ait été introduite en Europe puis qui soit partie à la conquête du monde (Rouxel, 2012). Grâce à sa grande plasticité, ce pathogène s'est rapidement adapté à de nouvelles conditions climatiques. Il est aujourd'hui possible de distinguer clairement les populations entre les grandes régions européennes (Gobbin et al., 2006). Ainsi, dans la plupart des cas, seuls un ou deux génotypes dominant par région (Pertot et al., 2003). Si lors de son arrivée en Europe, le pathogène s'attaquait surtout aux feuilles, il s'est rapidement adapté et des attaques sur grappes ont également été observées dès 1884 (Gessler et al., 2011).

1.4.2.1 Plantes hôtes et symptômes

Le mildiou de la vigne attaque plusieurs espèces de *Vitis*. Il existe 4 lignées évolutives indépendantes de *P. viticola* (Rouxel et al., 2013) qui s'attaquent chacune préférentiellement à des espèces de *Vitis* différentes (tableau 7).

Tableau 7: Sous-espèces de *P. viticola* adaptées préférentiellement à certaines espèces de vitis (d'après Rouxel et al., 2013)

Sous-espèce de <i>P. viticola</i>	Hôte : espèce sensible
Sp. Riparia	<i>V. riparia</i> et hybrides
Sp. Aestivalis	<i>V. aestivalis</i> , <i>V. labrusca</i> , <i>V. vinifera</i> et hybrides
Sp. Vinifera	<i>V. vinifera</i> et hybrides
Sp. Quinquefolia	<i>P. quinquefolia</i>

Si *V. vinifera*, d'origine européenne, est particulièrement sensible au mildiou, *V. labrusca* et *V. aestivalis* d'origine américaine peuvent également être touchés par la maladie tandis que *V. riparia* (également d'origine américaine) l'est nettement moins (Bush et Meissner, 1883 cité par Rouxel, 2012). Ce sont généralement les vignes sauvages qui sont résistantes aux maladies (Moreira et al., 2011). Certaines espèces de *Vitis* d'origine asiatique semblent également plus tolérantes au mildiou (Gessler et al., 2011). Les variétés de vigne résistantes au mildiou sont capables de stopper la croissance de l'hyphe dans le mésophylle, de sorte que ni sporulation, ni symptômes visibles ne sont observés (Diez-Navajas et al., 2008). Les cépages asiatiques tolérants au mildiou permettent la croissance de l'hyphe sur la feuille mais empêchent la pénétration dans les stomates et la production de sporanges viables (Jürges et al., 2009). Il existe également des différences de sensibilité en fonction des cépages.

Le mildiou, inféodé à la vigne, se développe principalement sur les organes herbacés de la vigne, surtout en croissance. Les dommages sur feuilles et sur grappes peuvent être

considérables si les conditions sont favorables au développement de la maladie, tels que des printemps chauds et humides.

L'expression des symptômes diffère en fonction de l'âge de la feuille, les jeunes feuilles étant plus sensibles que les feuilles plus âgées. Le mildiou pénètre dans la feuille par les stomates de la face inférieure (Kennelly et al., 2005). Comme c'est un organisme endophyte, on ne perçoit pas au début l'évolution de sa colonisation qui se fait à l'intérieur des tissus de la face inférieure de la feuille. Toutefois les dégâts occasionnés sur les cellules dont il se nourrit finissent par être visibles sur la face supérieure de la feuille avec l'apparition de nécroses ressemblant à des taches d'huile (figure 26A1) en début de saison puis en forme de mosaïque en fin de saison. Au bout de quelques jours on peut percevoir au niveau des tâches, sur la face inférieure de la feuille, un feutrage blanc (figure 26A2) qui témoigne de la phase de sporulation et de dispersion de l'oomycète.

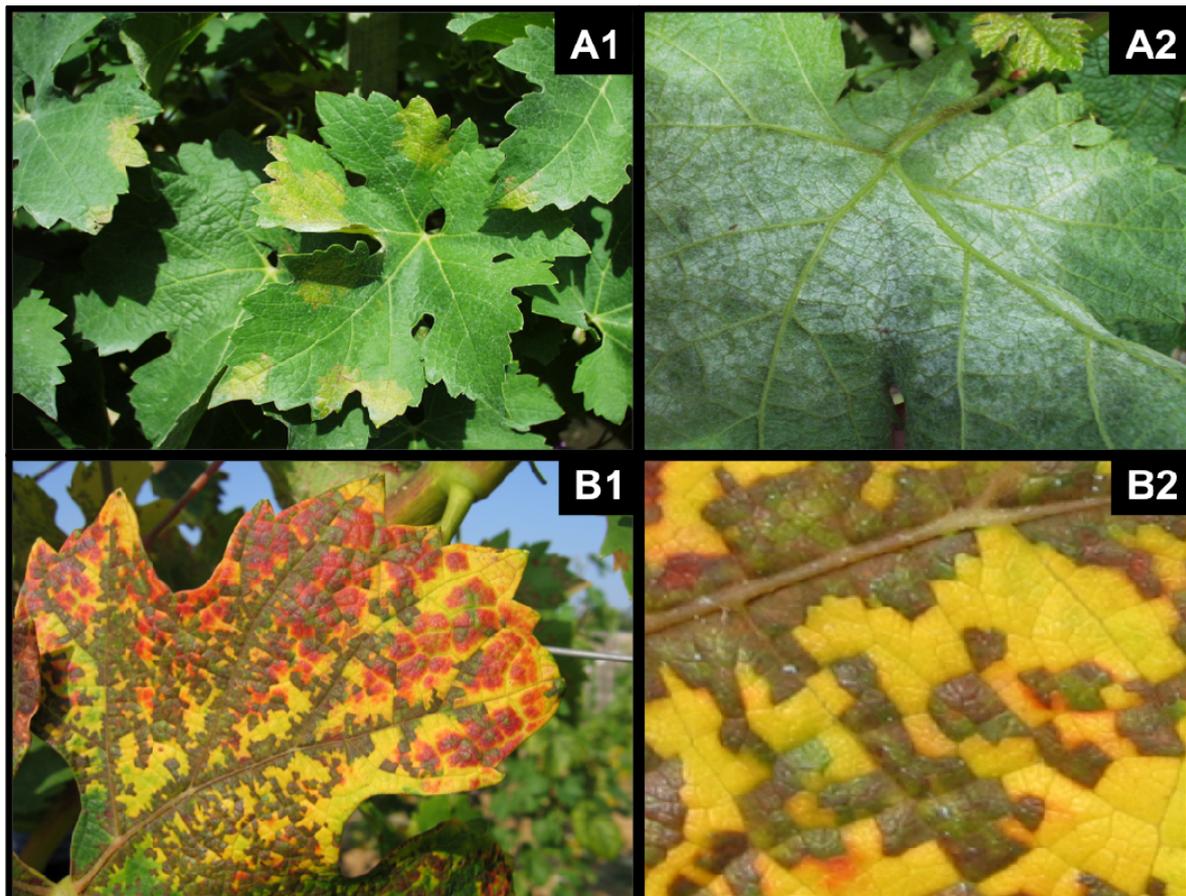


Figure 26 : Symptôme de tache d'huile sur la face supérieure de la feuille (A1) visible en début de saison et feutrage blanc observable sur la face inférieure de la feuille (A2). Symptôme mosaïque de mildiou sur la face supérieure de la feuille observable en fin de saison (B1 et B2) (INRA)

A l'automne, les vaisseaux ont des membranes plus résistantes, ce qui limite le développement spatiale du champignon entre les nervures de la feuille d'où l'aspect mosaïque (figure 26B1 et 26B2).

Le mildiou s'attaque également aux grappes : la pénétration s'effectue aussi par les stomates puis on retrouve la présence d'un feutrage blanc sur les baies (figure 27). On distingue les symptômes de rot gris particulièrement développé sur jeunes grappes (de diamètre < 6mm) lors de printemps pluvieux (figure 27A et 27B), du rot brun favorisé davantage par les pluies estivales sur les grappes plus âgées à partir du stade fermeture de grappe (figure 27C).

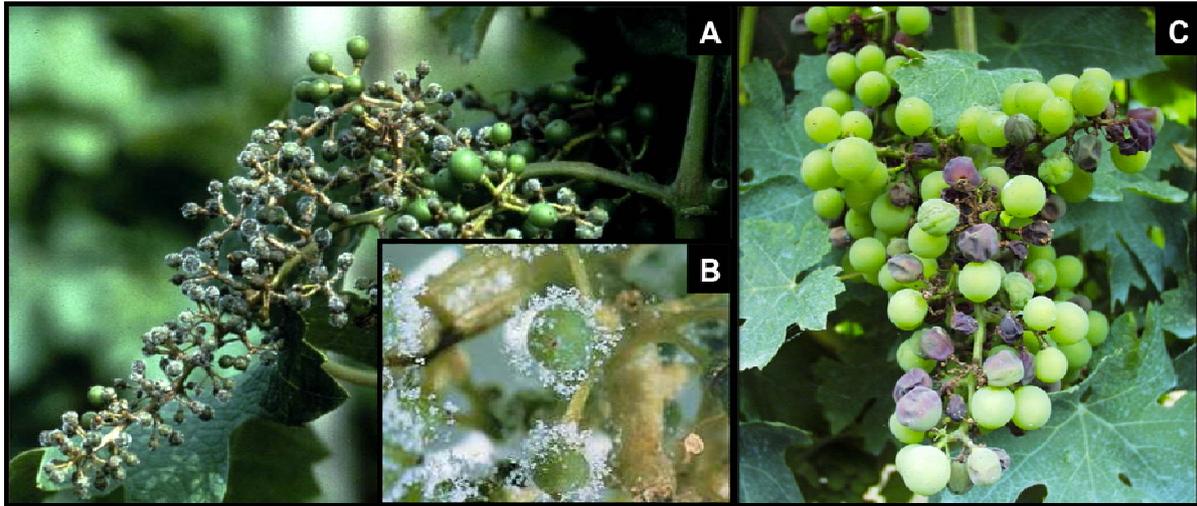


Figure 27 : Symptôme de rot gris (A et B) et de rot brun (C) de mildiou sur grappe (ephytia, INRA)

1.4.2.2 Biologie et stades de développement de *Plasmopara viticola*

Le cycle biologique de ce biotrophe obligatoire est composé d'une phase sexuée pendant l'hiver avec une phase de conservation sous forme d'oospores, et de plusieurs phases asexuées durant la saison végétative de la vigne (figure 28). Il se développe sous des températures comprises entre 15 et 20°C avec des précipitations d'au moins 10 mm (Wong et al., 2001). C'est pourquoi, il est particulièrement actif d'avril à octobre.

Infection primaire

Après l'hiver, la première infection nécessite des températures supérieures à 10°C et une humidité relative de plus de 60 %. Elle débute généralement lorsque les feuilles font 10 cm de large (Gessler et al., 2011). La germination des oospores donne naissance à des sporanges primaires qui émettent eux-mêmes de nombreuses zoospores. Les zoospores sont transportées par les éclaboussures dues à la pluie qui tombent sur les feuilles et vont contaminer la végétation proche du sol à 1 ou 2 m de distance (Gobbin et al., 2005). Les zoospores possèdent deux flagelles pour faciliter leur dispersion en présence d'eau à destination des stomates (Gessler et al., 2011). La germination des zoospores a lieu dans les stomates (Müller-Thurgau, 1911). Elle nécessite des températures entre 13 et 33°C avec un optimum à 25°C. Le mycélium émis provoque alors la contamination primaire. Au bout de 10 à 20 jours d'incubation, les filaments mycéliens produisent des conidiophores (fructifications contenant les conidies), débutent alors les infections secondaires. □

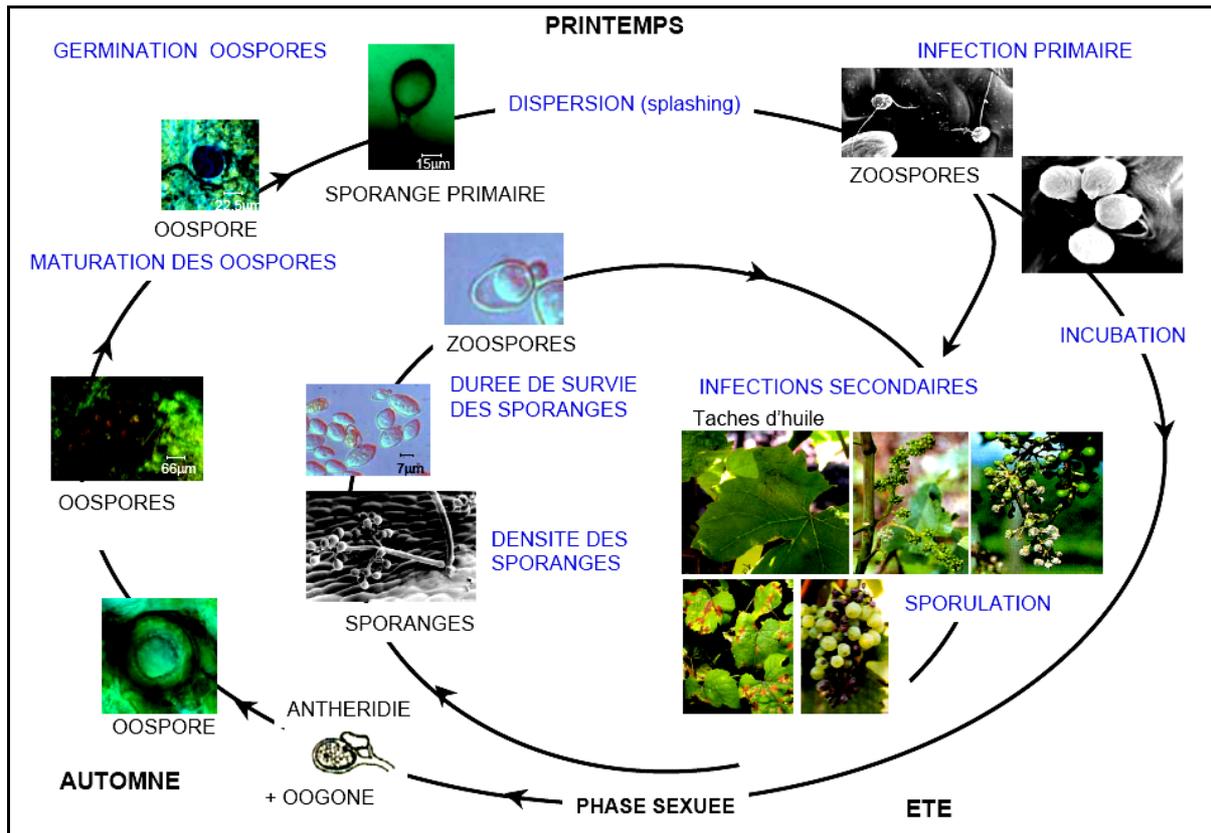


Figure 28 : Cycle de développement de *Plasmopara viticola* par Olivier Viret (Agroscope RAC Changins)

Infections secondaires

Il s'agit d'une phase de multiplication par reproduction asexuée. Au bout de quelques jours, apparaissent des conidies (spores végétatives) à la face inférieure des feuilles, visibles sous forme de taches blanches correspondant aux taches d'huile de la face supérieure de la feuille. Ces conidies émettent des sporanges qui libéreront à leur tour des zoospores (Dubos, 2002). La sporulation est optimale pour une température $>19^{\circ}\text{C}$. L'infection nécessite une période de 4 heures sans lumière et en présence d'eau à la surface inférieure des feuilles pour faciliter la libération et le déplacement des zoospores vers les stomates (Gessler et al., 2011). Ces zoospores transportées par les gouttes de pluies, propagent la maladie entre les différents organes de la plante ou entre des ceps voisins à 130 m de distance (Gobbin et al., 2007). La dissémination des spores pourrait se faire aussi à plus longue distance par transport anémophile comme c'est le cas pour d'autres oomycètes, mais cela n'a pas encore été démontré pour *P. viticola* (Gobbin et al., 2007). Les cycles secondaires peuvent être très courts avec une incubation de 5-6 jours quand les conditions sont favorables (si la température est comprise entre 15 et 20°C et les précipitations de 10 mm minimum). La contamination est polycyclique et dure pendant toute la période végétative.

Incubation

Les zoospores sont attirées par les stomates ouverts, probablement en suivant un gradient croissant de concentration en oxygène. Quatre ou cinq zoospores s'agglomèrent autour du stomate ouvert puis s'enkystent (Müller-Thurgau, 1911). Les zoospores peuvent débuter le processus d'infection une à deux heures après leur arrivée sur les feuilles (Kortekamp et Zyprian, 2003). La germination des zoospores a lieu environ 12 à 15 heures après leur enkystement (Kortekamp et Zyprian, 2003). Chaque zoospore enkystée émet alors un tube germinatif qui pénètre dans le stomate pour former la vésicule sous-stomatique (Rouxel, 2012) dans laquelle passe le cytoplasme de la zoospore. Cette phase du cycle est rapide car les

zoospores sont fragiles, sensibles à la dessiccation et ont une capacité de synthèse limitée en dehors des tissus de l'hôte. Un mycélium se forme au contact des cellules de l'hôte puis se développe et se ramifie entre les cellules voisines du mésophylle (Jürges et al., 2009). Les hyphes restent extracellulaires et envoient des haustoria ou suçoirs à l'intérieur des cellules pour prélever les nutriments dont ils ont besoin (figure 29). Les hyphes envahissent les tissus entourant la zone inoculée en deux à trois jours (Kortekamp et Zyprian, 2003). Si les tissus lacuneux sont aisément colonisés, la conquête des tissus lignifiés des rameaux et des grappes est plus lente tandis que la progression devient impossible dans les vaisseaux des feuilles plus âgées d'où l'aspect mosaïque.

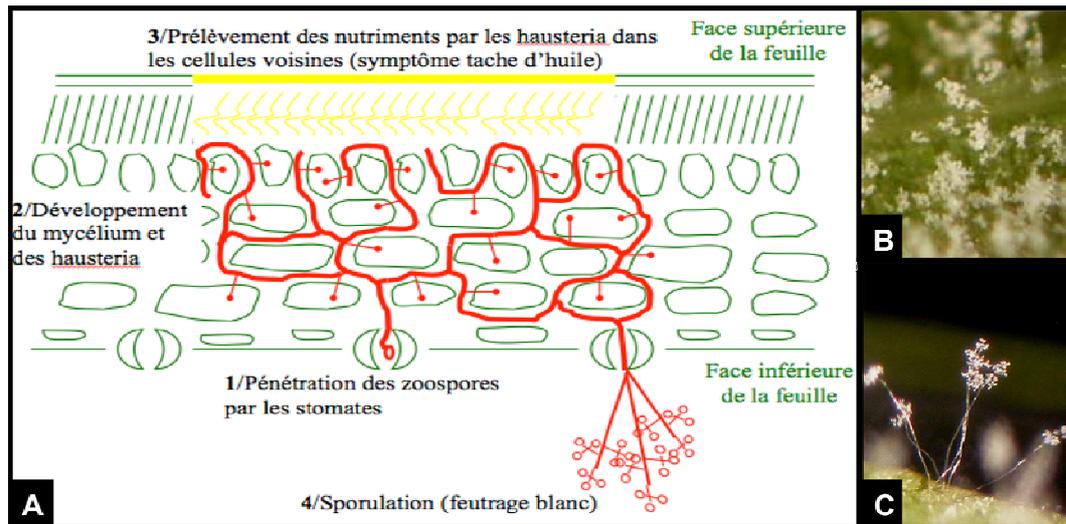


Figure 29 : Phases d'incubation et de sporulation de *P. viticola* sur feuille (A) (Delière L., INRA), conidiophores de *P. viticola* (B et C) (ephytia, INRA)

Cette incubation invisible dure de 5 à 10 jours sur feuilles et jeunes grappes, voire davantage s'il fait froid, tandis qu'elle est plus longue sur grappes après nouaison. Elle s'achève par l'apparition des "taches d'huile" sur les feuilles (figure 26B).

Sporulation

En général, la sporulation a lieu après l'apparition des taches. Les hyphes qui ont envahi la cavité sous-stomatique gonflent puis donnent des conidiophores qui passent par l'ouverture des stomates : chaque ramification porte des sporanges de 16 à 20 μm de long et 10 à 15 μm de large remplis de zoospores (figure 29B et 29C). Cette phase se caractérise par un feutrage blanc à proximité des stomates sur la face inférieure des feuilles ou sur les baies (figure 26A2 et 27).

Conservation

A la fin de l'été, la diminution de la photopériode et de la température induisent la formation des oospores d'hiver (Rouxel, 2012). L'oospore, issue de la reproduction sexuée par hétérogamie, est la forme de conservation. Les oospores ou zygotes se forment dans "les points de tapisseries" des feuilles qui caractérisent le mildiou d'arrière saison. Ces oospores se forment par fécondation d'un spermatocyste et d'une oogone. Les oospores ainsi formées hibernent et se conservent dans la terre sur feuilles mortes après la chute des feuilles ce qui leur permet de résister aux froids hivernaux (-20°C, -25°C).

1.4.3 Les dépérissements dus à *Botryosphaeria sp.*

Les *Botryosphaeria sp.* appartiennent au règne des Ascomycota (Ascomycètes), à l'ordre des Botryosphaeriales et à la famille des Botryosphaeriaceae. Ce sont des champignons autotrophes et saprophytes.

Les maladies du bois touchent l'ensemble des organes aériens de la vigne qu'ils soient lignifiés ou non. Les maladies du bois d'origine cryptogamiques, sont principalement composées de trois maladies : l'eutypiose causée par *Eutypa lata*, l'esca provoquée par un cortège de champignons pathogènes dont *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phomopsis sp.* et les dépérissements dus aux *Botryosphaeria sp.* Du fait, de leur symptomatologie sur bois assez proches, ces 3 maladies ont souvent été confondues autrefois. L'esca est la maladie décrite sur vigne la plus ancienne puisqu'elle est connue depuis l'antiquité. Bien que les premières descriptions d'eutypiose par Bel remontent à 1890 sur vigne, elles ont également été mises en évidence sur groseillier par Barthelet en 1938 et sur abricotier par Carter en 1957 (Dubos, 2002). Le lien avec l'agent pathogène *E. lata* n'a été formellement établi qu'en 1978 (Moller et Kasimatis, 1978). Quant aux dépérissements dus aux *Botryosphaeria sp.*, les symptômes ont été décrits pour la première fois par Lehoczky en 1974. Comme les *Botryosphaeriaceae* se développent fréquemment dans les nécroses du bois provoquées initialement par l'esca ou par l'eutypiose, la confusion entre ces trois maladies a longtemps perduré et persiste encore aujourd'hui ponctuellement. De fait, les nécroses observables sur bois sont proches pour ces 3 maladies à un stade avancé. Il est plus aisé de les distinguer à un stade plus précoce.

Si l'eutypiose et l'esca sont présentes sur tous les vignobles du monde, la maladie de dépérissement due aux *Botryosphaeriaceae* se rencontre surtout dans les pays au climat chaud comme l'Australie (Pitt et al., 2013), l'Iran (Mohammadi et al., 2013), l'Afrique du sud (Van Niekerk et al., 2004), l'Égypte, l'Israël, le Brésil (Camara et al., 2013), l'Argentine, le Chili (Diaz et Latorre, 2013), la Californie (Dubos, 2002, Urbez-Torres et al., 2007), La Nouvelle Zélande (Amponsath et al., 2011, Billones-Baaijens et al., 2014) et plus récemment le sud de l'Europe (Martos et al., 2008). Avec le réchauffement observé cette dernière décennie, on constate une progression de cette maladie dans le monde (Larignon et al., 2009).

1.4.3.1 Plantes hôtes et symptômes

Les *Botryosphaeriaceae* ne sont pas inféodés à la vigne et affectent un grand nombre d'autres plantes ligneuses (Punithalingam et Holliday, 1973). De fait, de nombreuses sources d'inoculum peuvent se situer dans l'environnement des vignes. De plus, une espèce de *Botryosphaeriaceae* n'a pas la même virulence et ne provoque pas les mêmes symptômes d'une région à l'autre. Par exemple, en Californie, des symptômes comme une chlorose des feuilles, un raccourcissement des entre-nœuds et une décomposition du sarment sont observés alors que ces symptômes ne s'expriment pas dans le vignoble européen (Chiarappa, 1959 cité par Larignon et al., 2009).

Les premiers symptômes apparaissent de la sortie des feuilles au stade de grappes visibles, notamment après les premières chaleurs. (Darrietort et Lecomte., 2007, Lecomte et al., 2012). Ils peuvent être très variés comme une forte mortalité des jeunes pousses, une nécrose des bourgeons, une chlorose foliaire, des taches foliaires, un dessèchement des inflorescences et des grappes ou des pourritures sur fruits (Bertsch et al., 2013). Une réduction de la vigueur, de la croissance des jeunes pousses, un retard de débourrement, un blanchiment d'écorce et une décoloration des rameaux ont également été observés. Cette maladie ne présentant pas de

symptômes foliaires spécifiques, il faut retirer l'écorce du bois pour pouvoir observer les symptômes caractéristiques de *Botryosphaeria sp.* sur bois.

Sous l'écorce, des stries brunes apparaissent dans un premier temps suivi par des bandes longitudinales ou sectorielles (figure 30A), ensuite des nécroses qui progressent de la périphérie vers le centre et enfin des chancres au stade plus avancé (figure 30B). Le xylème est principalement affecté mais le phloème peut également être touché. Ces nécroses apparaissent à proximité d'anciennes nécroses souvent dues à des plaies de taille, d'épamprage, de greffage ou des craquelures (Lecomte et al., 2006) ou suite à des lésions provoquées par d'autres pathogènes (figure 30C). La progression des nécroses et l'obstruction des vaisseaux conducteurs par la plante elle-même pour freiner la propagation de la maladie finit par entraîner le dépérissement du cep puis sa mort.

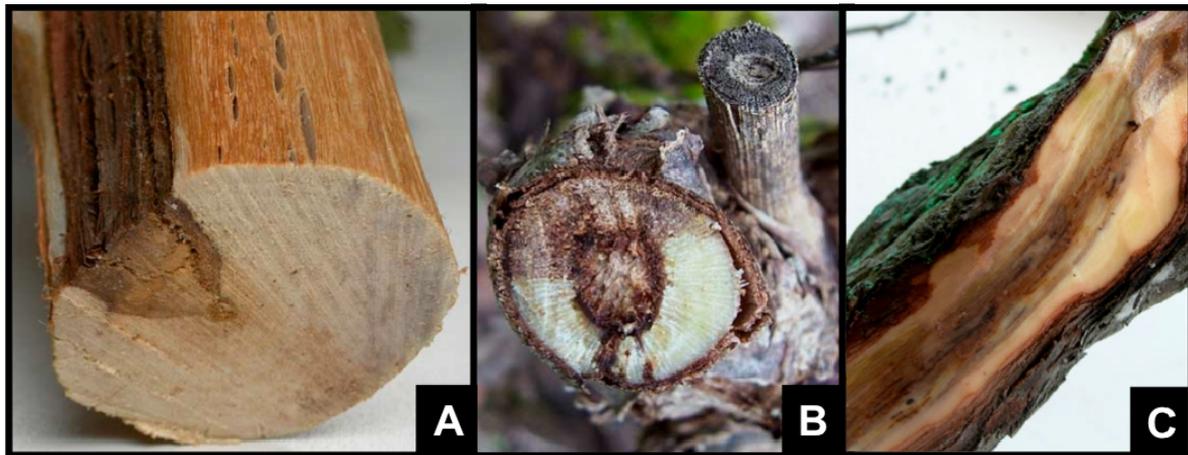


Figure 30 : (A) lésion sectorielle, (B) chancre à *Botryosphaeria sp.* sur vigne, (C) lésion lésion provoquée par l'esca propice à une colonisation ultérieure par les *Botryosphaeria sp.* (ephytia, INRA)

Certains portes greffes comme 5C et SO4 et certains cépages comme Thompson seedless, Flame seedless, Ugni blanc, Superior, Fiesta Pinot noir, Riesling, Chardonnay, Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon ou Merlot sont plus sensibles à cette maladie que d'autres tels que Perlette, Romi, Red Globe ou Ruby seedless (Dubos, 2002, Amponsath et al., 2011, Billones-Baaijens et al., 2014). Certaines pratiques culturales comme l'excès de fertilisation ou un stress hydrique semblent également favoriser cette maladie (Van Niekerk et al., 2011).

1.4.3.2 Biologie et stade de développement de *Botryosphaeria sp.*

On parle généralement de *Botryosphaeria sp.* car 21 espèces seraient responsables des symptômes sur vigne (Bertsch et al., 2013). Elles ont parfois été isolées dans le même vignoble. On distingue huit espèces appartenant aux Néofusicoccum (*N. parvum*, *N. luteum*, *N. australe*, *N. ribis*, *N. vitifusiforme*, *N. viticlavatum*, *N. macroclavatum*, *N. mediterraneum*), quatre espèces de la famille des Diplodia (*D. mutila*, *D. seriata*, *D. porosa*, *D. corticola*) quatre espèces de la famille des Dothiorella (*Do. Iberica*, *Do. americana*, *Do. Sarmentorum*, *Do. Viticola*), quatre espèces de la famille des Lasiodiplodia (*L. theobromea*, *L. crassipora*, *L. missouriana*, *L. viticola*) et l'espèce *Fusicoccum aesculi*.

Certaines des espèces de *Botryosphaeriaceae* ont un rôle d'endophytes couramment présentes sur bois sains, ou ont un pouvoir pathogène latent qui s'exprime généralement suite à un stress biotique et/ou abiotique subi par la plante, notamment un stress hydrique. La contamination peut se faire précocement en pépinière à partir des vignes mères ou lors du

greffage (Billones-Baaijens et al., 2012, Billones-Baaijens et al., 2013) tandis que certaines espèces opportunistes se développent à la moindre lésion sur bois comme les plaies de taille hivernale ou suite à l'infection par d'autres pathogènes (Amponsath et al., 2011). Trois à quatre jours après l'apparition d'une lésion sur bois, un cortège de pathogènes endophytes opportunistes s'installent : *Phaeoconiella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum* souvent associés à l'esca, *Phomopsis sp* fréquents dans toutes les lésions ainsi que *Botryosphaeria sp*. Puis, ces dernières deviennent majoritaires quelques mois après lorsque les nécroses deviennent brunes (Lecomte et al., 2010). Les *Botryosphaeria sp*. qui colonisent le bois produisent des composés phytotoxiques lipophiles ou exopolysaccharides (à partir de glucose, mannose, galactose) (Martos et al., 2008) qui lui permettent de dégrader les parois cellulaires des vaisseaux conducteurs.

Des différences de pathogénicité ont été mises en évidence entre les souches et les espèces. Par exemple *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum luteum* et *Lasiodiplodia theobromae* sont les plus virulentes, suivies par *Neofusicoccum australe*, *Fusicoccum aesculi* et *Diplodia mutila*, et enfin par *Dothiorella viticola*, *Dothiorella iberica* et *Diplodia seriata*, moins pathogènes que les précédents (Laveau et al., 2009, Amponsath et al., 2011, Pitt et al., 2013). *Neofusicoccum parvum* est considéré comme l'espèce la plus virulente compte tenu de la taille des nécroses qu'elle provoque (Martos et al., 2008, Pitt et al., 2013, Billones-Baaijens et al., 2013, Chen et al., 2014). De plus si *Neofusicoccum parvum* est unanimement virulent sur tous les continents, ce n'est pas toujours le cas pour d'autres espèces. Par exemple *N. umdonicola* et *N. Batangarum* ne sont présents que sur deux continents (Sakaladis et al., 2012). La virulence s'exprime donc différemment en fonction des espèces pathogènes et des régions viticoles. Par contre, aucune étude à ce jour n'a mis en évidence de variété ou de cépage résistants aux *Botryosphaeria sp*. (Spagnolo et al., 2014, Billones-Baaijens et al., 2014).

Incubation

Les pycnides souvent de couleur brunes, de 100 à 600 µm de diamètre selon les espèces, se forment en groupe ou isolément (Dubos, 2002) au printemps. Les conidies (spore asexuée), qui se développent dans les pycnides sont d'abord hyalines au cours de leur formation puis brunissent lors de leur maturation (figure 31C). La maturité des conidies est atteinte en 23 jours à 26°C (Melzer et Berton, 1986)

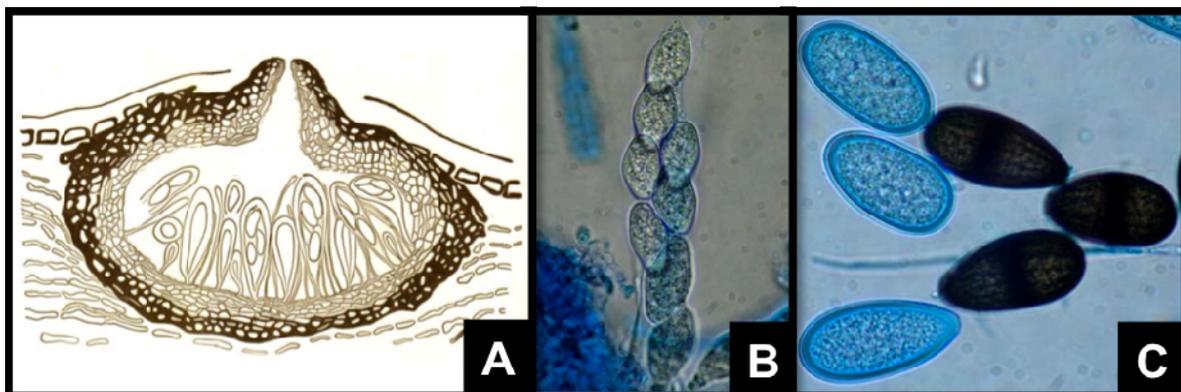


Figure 31 : (A) Périthèce portant des asques (B) contenant des conidies (C) de *Botryosphaeria sp*. (ephytia, INRA)

Lors des périodes humides durant la période végétative, les pycnides libèrent des pycniospores ou conidies, parfois mélanisées selon les espèces. Projetées par les

éclaboussures d'eau jusqu'à deux mètres de distance (Baskarathevan et al., 2013), ces spores pénètrent dans la vigne préférentiellement par les plaies de taille qui peuvent mettre plusieurs mois à cicatriser. L'optimum de germination des conidies se situe entre 25 et 30°C selon les espèces bien que la germination puisse avoir lieu entre 10 et 40°C (Melzer et Berton, 1986, Urbez-Torres et al., 2010). Un tube germinatif se forme suivi par un mycélium. Le mycélium d'abord blanc devient gris-brun puis noir avec le temps au fur et à mesure de sa mélanisation. L'optimum de croissance du mycélium s'effectue entre 22 et 30°C (Dubos, 2002, Pitt et al., 2013). La grande amplitude de température favorable au développement de *Botryosphaeria sp.* explique sa large répartition géographique dans le monde.

Sporulation

La température influence peu la période de sporulation qui peut avoir lieu en été comme en hiver au-dessus de 5°C. Par contre, une forte humidité relative est indispensable à la dispersion des spores. La dispersion est favorisée lors des pluies ou en cas d'irrigation par aspersion (Urbez-Torres et al., 2010). La contamination peut s'effectuer d'abord sur les organes herbacés pour atteindre ensuite les parties ligneuses.

Conservation

La phase de conservation durant l'hiver s'effectue le plus souvent sous la forme de pycnides (asexuée) et très rarement sous la forme sexuée (périthèces) dans les bois de vigne, au niveau des écorces, des débris de taille ou des bois malades. Le périthèce (figure 31A) comporte des asques contenant chacun 8 ascospores (31B).

Ces trois bio-agresseurs ont des cycles de vie très différents, ne visent pas les mêmes organes (feuille, sève, tronc) ou pas au même stade phénologique, mais tous occasionnent des dégâts considérables au vignoble. Leur relation avec la vigne est étroite, puisque certains sont inféodés à cette espèce végétale, ce qui explique que nous les avons choisis pour cette étude.

1.5 Les hypothèses et objectifs de l'étude

Nous avons vu précédemment qu'en France, le cuivre en tant que produit fongicide, est couramment utilisé pour lutter contre les maladies en vigne, et que les études réalisées ces dernières années sur la contamination des sols montrent une accumulation importante du cuivre dans les sols viticoles. La phytotoxicité du cuivre s'exprime au-delà d'une certaine concentration de métal biodisponible pour le végétal, variable selon les caractéristiques de sol et dépendant de chaque espèce végétale. La phytotoxicité cuprique peut entraîner des modifications cellulaires, métaboliques et morphologiques. En particulier nous avons vu qu'un stress métallique induisait un stress oxydant et qu'il pouvait modifier la composition chimique des cellules végétales ou de la sève.

Par ailleurs on sait que les bio-agresseurs choisissent leur plante hôte en tenant compte de caractères morphologiques et métaboliques.

Compte tenu de tous ces éléments, on peut supposer que le cuivre en excès dans le sol pourrait induire des variations morphologiques, métaboliques ou cellulaires dans la vigne, susceptibles de modifier les rapports entre la plante hôte et ses bio-agresseurs.

L'objectif général de ce mémoire consiste donc à déterminer si l'accumulation de cuivre dans le sol rend la vigne plus sensible à un cortège de bio-agresseurs.

Cet objectif est décliné en trois grandes questions scientifiques, chacune d'elle faisant l'objet d'un chapitre dans ce manuscrit (figure 32):

1/ Quelles sont les niveaux de contamination rencontrés dans une zone viticole et peut-on relier les caractéristiques du sol à la disponibilité en cuivre ?

2/ Quels sont les mécanismes d'absorption et de translocation du cuivre dans la vigne ? Quels sont les effets d'une contamination en cuivre sur la composition chimique des organes de la vigne et sa morphologie? La sensibilité de la vigne au cuivre est-elle variable selon les cépages et les porte-greffes utilisés ?

3/ Les interactions vigne-bio-agresseurs dépendent-elles de la contamination cuprique de la plante ? Quelles perturbations du fonctionnement de la vigne par le cuivre engendrent une modification de ces interactions ?

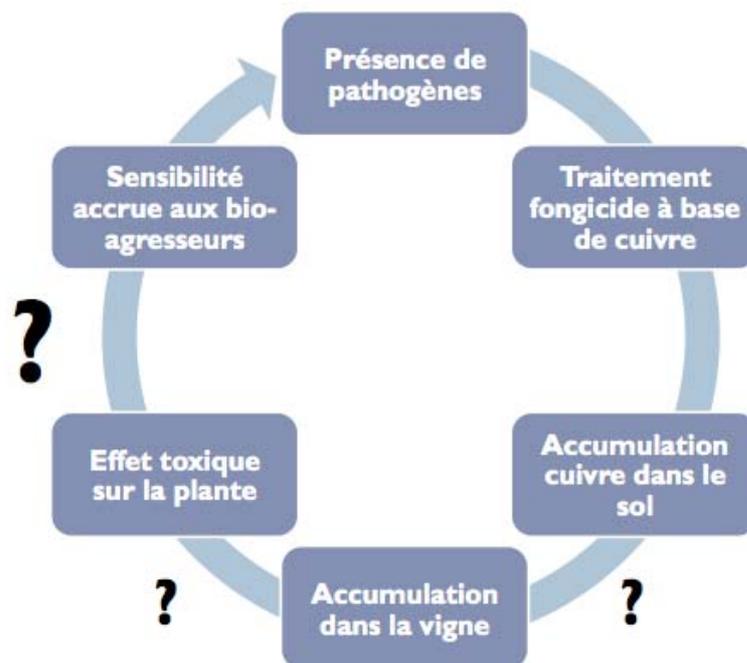


Figure 32: Le processus impliquant la contamination cuprique des sols dans l'interaction vigne-bio-agresseur

Pour déterminer les caractéristiques du sol induisant une augmentation de la disponibilité du cuivre, une étude a été réalisée sur des échantillons de sol prélevés sur 47 parcelles viticoles en appellation Pessac-Léognan. Nous avons pu obtenir un gradient de contamination cuprique des sols et des caractéristiques de sol, notamment structure, pH et teneur en matières organiques variées afin d'avoir un panel représentatif des parcelles de cette appellation. La zone géographique étroite de cette appellation (1600 hectares) nous permet de nous affranchir d'autres facteurs abiotiques comme le climat.

Pour évaluer les effets d'une contamination cuprique sur la vigne, des boutures franches, c'est à dire non greffées sont exposées artificiellement à 4 concentrations de cuivre en milieu contrôlé, concentrations couvrant la gamme de variation déterminée sur les échantillons de sols précédents. Nous avons déterminé l'évolution de la distribution du cuivre dans les différents organes de la vigne (racines, tiges, jeunes et vieilles feuilles). Ceci nous a permis d'évaluer d'une part si les concentrations mesurées sur le terrain étaient théoriquement susceptibles d'entraîner des effets délétères sur la vigne et d'autre part si la morphologie ou la composition chimique des organes cibles des bio-agresseurs était modifié. Cela a été testé sur trois cultivars dont la sensibilité au mildiou est variable le porte-greffe 101.14 (peu sensible) et deux cépages utilisés habituellement comme greffons le Merlot, le Cabernet Sauvignon (très sensible).

Enfin, pour estimer l'impact de cette contamination sur les interactions vigne-bio-agresseurs, nous avons choisi trois bio-agresseurs modèles :

- *P. viticola* qui pénètre par les stomates et franchit les parois végétales, pour se nourrir dans les cellules végétales voisines. Il pourrait être défavorisé en cas de stress métallique, qui entraîne par homologie au stress hydrique, la fermeture des stomates, et qui conduit, en cas de forte contamination, à une rigidification des parois.
- *Botriosphaeria sp.* dont le pouvoir pathogène latent s'exprime suite à un stress biotique et/ou abiotique subi par la plante, notamment un stress hydrique. Il pourrait donc être favorisé par un stress métallique.
- Enfin, *S. titanus*, qui choisit sa plante hôte sur des critères morphologiques et gustatifs. Il pourrait être influencé par une modification morphologique des feuilles, un épaissement de la cuticule ou une modification de la composition chimique de la sève entraîné par un excès de métaux dans le sol.

Nous avons donc inoculé les deux pathogènes *P. viticola* et *Botriosphaeria sp.* en milieu contrôlé puis nous avons évalué la croissance des colonies. Nous avons également réalisé un test de choix entre des plantes plus ou moins contaminées en cuivre avec *S. titanus*.

Cette étude pourrait permettre de faire des avancées significatives dans la compréhension de l'évolution des communautés de bio-agresseurs en fonction des activités anthropiques. Il pourrait également être transposable à d'autres cultures (arboriculture notamment) et participer au pilotage de nouveaux systèmes de cultures par des propositions d'améliorations de l'itinéraire cultural.

Chapitre 2: Evaluation de la disponibilité du cuivre dans les sols viticoles

Dans ce chapitre, nous cherchons à déterminer (1) quelles sont les gammes de variation de la concentration en cuivre total et disponible dans les sols d'une petite région, correspondant à une appellation et assimilable à un terroir (2) quels sont les facteurs explicatifs de la teneur totale du cuivre retrouvé dans les sols et (3) quelles sont les facteurs physicochimiques jouant sur la disponibilité du cuivre des sols.

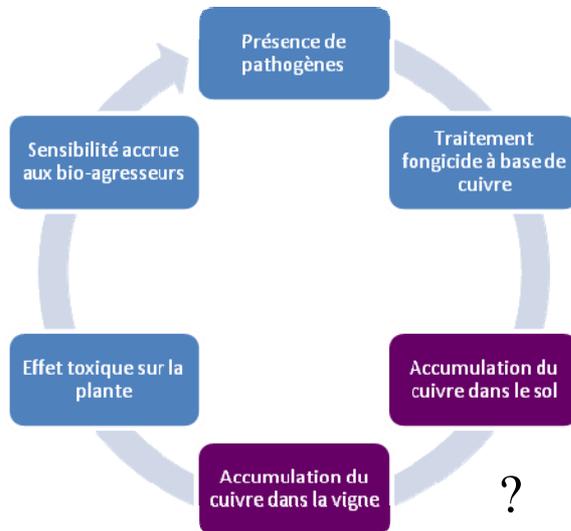


Figure 33: Question traitée dans ce chapitre par rapport au cadre général de la thèse

Dans un premier temps, nous avons sélectionné 47 parcelles issues la zone d'AOC Pessac-Léognan, une petite région au sud de Bordeaux présentant des conditions climatiques homogènes. Ces parcelles viticoles ont des caractéristiques physico-chimiques et des antécédents viticoles variés. Nous avons prélevé du sol à deux profondeurs (0-20 cm et 20-40 cm) et réalisé un profil complet jusqu'à 1m pour trois d'entre elles. .

Afin d'estimer la disponibilité en cuivre des sols viticoles, la teneur en cuivre de différentes fractions du sol a été couplée à plusieurs caractéristiques du sol des 47 parcelles viticoles pour la première couche H1(0-20 cm) (figure 34). Les caractéristiques du sol retenues sont la granulométrie, les matières organiques MO, le pH, la capacité d'échanges cationiques CEC et la teneur en CaCO₃.

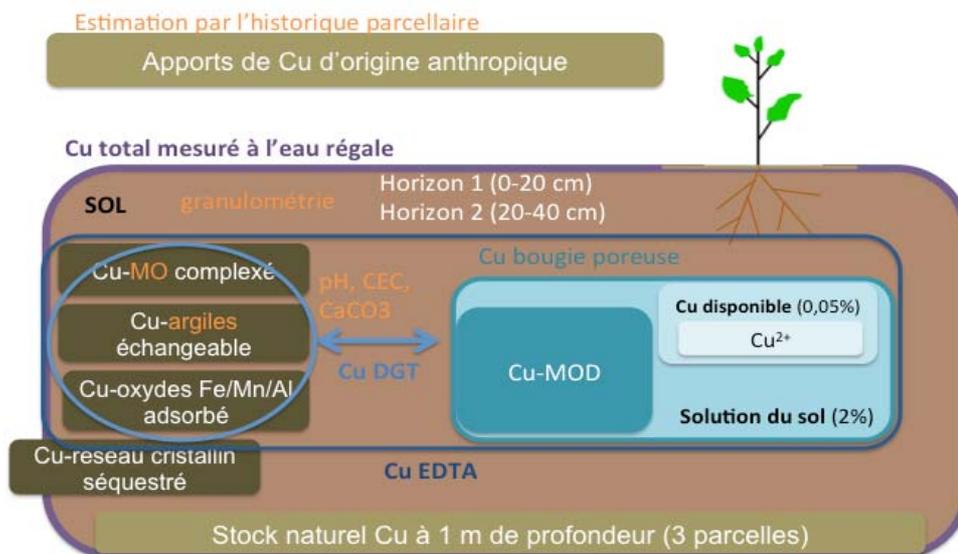


Figure 34: Teneurs en cuivre des différentes fractions du sol que nous avons mesuré

2.1 Matériels et méthodes

Afin de comprendre les facteurs influençant la disponibilité du cuivre dans les sols viticoles, nous avons mesuré la teneur en cuivre total et la teneur en cuivre disponible de 47 parcelles viticoles ayant des caractéristiques physico-chimiques et un antécédent viticole variés.

Choix des parcelles

Toutes les parcelles viticoles sélectionnées se situent en appellation d'origine contrôlée (AOC) Pessac-Léognan (figure 35). L'appellation Pessac-Léognan regroupe 75 châteaux situés sur 10 communes dans les Graves, une subdivision du vignoble de Bordeaux qui date de 1987. Les 1600 hectares de vigne bénéficiant de cette appellation, produisent 10 millions de bouteilles annuelles dont 80% de vins rouges et 20% de vins blancs secs, cette appellation a produit en 2009 un peu plus de 71000 hl.

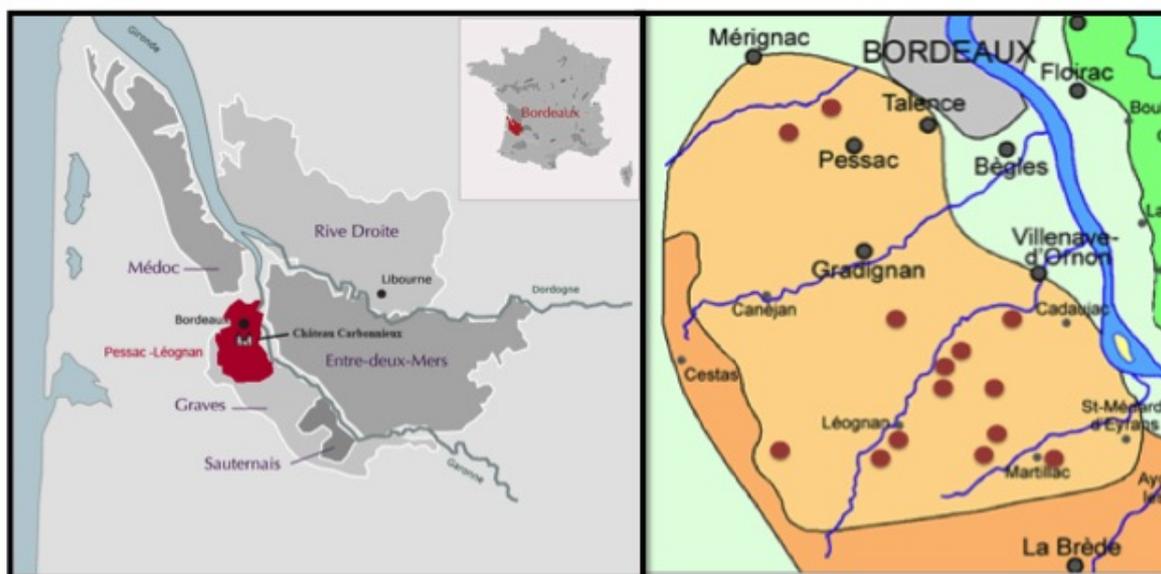


Figure 35: Localisation du vignoble de Pessac-Léognan (A) et des quatorze châteaux où se situent les parcelles étudiées en Pessac-Léognan (B)

47 parcelles viticoles appartenant à 14 châteaux différents ont été sélectionnées à partir d'une enquête (questionnaire joint en annexe) auprès des chefs d'exploitations des domaines, de manière à avoir un panel le plus large possible de teneur en cuivre disponible, selon 3 caractéristiques :

- l'historique parcellaire (culture en vigne ancienne ou récente) car une parcelle cultivée en vigne depuis longtemps a accumulé davantage de cuivre suite aux nombreux apports qui ont été fait,
- le pH
- et le taux de matières organiques, ces deux derniers paramètres étant connus pour influencer fortement la disponibilité du cuivre.

Les parcelles sont toutes situées à moins de 15 km les unes des autres. On considère donc que les conditions climatiques sont homogènes sur cette zone. Ce sont majoritairement des parcelles de Cabernet Sauvignon et de Merlot qui sont retenues, mais on trouve également du

Cabernet Franc, du Sauvignon et du Sémillon. Les parcelles sont parfois en mono-cépages, parfois en cépages mélangés. Les ceps sont espacés de 1 mètre sur le rang, les inter-rangs de vigne mesurent de 1 mètre à 1 mètre 60 selon les parcelles, la densité de plantation étant d'au moins 6500 pieds x ha⁻¹.

Prélèvement des échantillons de sol

Les prélèvements de sol sont réalisés en hiver ou au début du printemps avant le débourrement, sous le rang de vigne. 6 sous-échantillons sont prélevés à l'aide d'une tarière (figure 36) puis mélangés afin de constituer un échantillon représentatif d'environ 2 kg de sol. Deux couches H1 (0-20 cm) et H2 (20-40 cm) sont prélevées sur chacune des 47 parcelles.

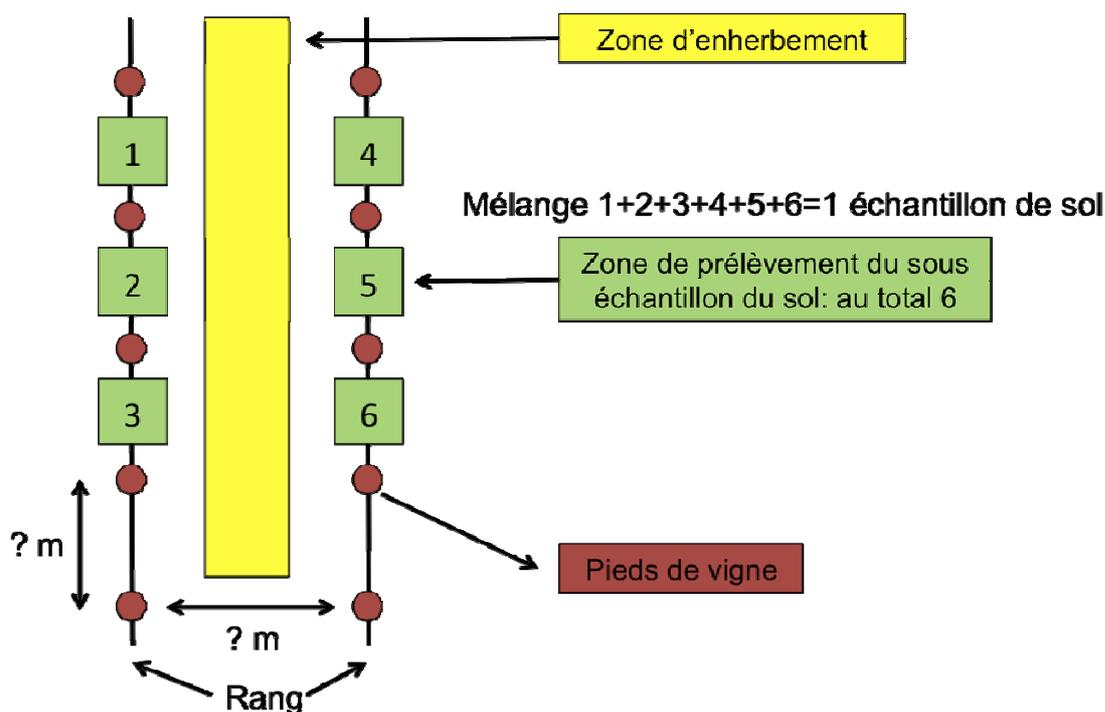


Figure 36: Dispositif de prélèvement de sol sur une parcelle viticole pour constituer un échantillon représentatif (d'après Sappin-Didier V., INRA Bordeaux Aquitaine)

Pour trois parcelles, P8, P14 et P28, le prélèvement d'un profil complet jusqu'à un mètre de profondeur a été effectué dans l'inter-rang à l'aide d'une tarière mécanisée.

Détermination des caractéristiques du sol

L'échantillon de sol est mis à sécher à l'air libre pendant trois semaines, tamisé à 2mm puis la terre fine obtenue est séchée pendant 3 jours dans une étuve à réglée à 55°C.

Les caractéristiques physicochimiques suivantes ont été mesurées pour chaque échantillon du sol sur la terre fine obtenue: granulométrie, capacité d'échange cationique (CEC), teneur en carbone total, carbone organique, azote, teneur en calcaire total, et pH.

La mesure du pH est réalisée au laboratoire. Vingt grammes de sol sont mélangés à 50 ml d'eau ultrapure Millipore puis placés pendant une heure sur une table d'agitation. Après avoir laissé le mélange reposer pendant un quart d'heure, le pH de la solution obtenue est mesuré à l'aide d'un pHmètre (SensIONTM + MM340). Trois répétitions sont effectuées par échantillon.

Les analyses suivantes ont été réalisées au laboratoire central INRA d'analyse des sols à Arras. La texture évaluée par granulométrie en cinq fractions sans décarbonatation est réalisée selon leur norme NF X 31-107. Les teneurs totales en carbone organique et en azote sont obtenues selon les normes NF ISO 10694 et NF ISO 13878 et permettent de calculer la teneur en matières organiques. La Teneur en calcaire total (CaCO_3) est mesurée selon la norme NF ISO 10693. La Capacité d'échange cationique (CEC) est mesurée par spectrophotométrie à la cobalthexamine au pH du sol selon la norme NF ISO 23470.

Mesures de la teneur en cuivre après minéralisation des échantillons de sol

La méthode de minéralisation choisie est la minéralisation à l'eau régale, mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique. Elle permet de solubiliser la quasi-totalité du cuivre dans le sol, sauf celui contenu dans les minéraux aluminosilicatés du sol. Pour cela, 500 mg de sol sec est broyé dans un broyeur à billes d'agate Retsch® PM400 puis séché à l'étuve pendant 24 h à 105°C. Le broyat est ensuite placé dans un tube en téflon contenant 3,75 ml d'acide chlorhydrique et 1,5 ml d'acide nitrique et minéralisé sous champ micro-onde (MARSX XM1256, CEM Corporation), pendant 25 minutes à 180°C. Le minéralisat est filtré avec du papier filtre puis ajusté à 100 ml avec de l'eau ultrapure. Un blanc d'attaque et un échantillon de référence (BCR n°142R : « Trace elements in a light sandy soil ») sont utilisés pour vérifier la qualité de la minéralisation et l'absence de pollution.

Teneur en cuivre extrait à l'EDTA

L'éthyle diamine tétra-acétique (EDTA) permet d'extraire toutes les formes complexées du cuivre présentes dans le sol. 2,5 grammes de terre fine (< 2mm) broyées au préalable sont placés dans 25 ml de solution d'EDTA sodique (0,05 M) préparée au laboratoire puis placés sur une table d'agitation pendant une heure. La solution est ensuite centrifugée à 1000 g pendant 15 minutes, puis filtrée à l'aide d'un papier filtre.

Teneur en cuivre de la solution du sol prélevée par une bougie poreuse

La bougie microporeuse (micropréleveur RHIZON MOM, Rhizosphere Research Products) permet de prélever la solution du sol. Pour cela, 700 g de sol tamisé humidifié à 50% sont placés dans une boîte en plastique fermée, dans une étuve à 27°C pendant 24 heures afin que les échanges sol-solutions se stabilisent. Ils sont ensuite humidifiés à 100% puis de nouveau placés à l'étuve à 27°C pendant 24 heures. Une bougie poreuse est ensuite placée au centre de la boîte. Au bout de 24 h, la bougie est mise en dépression au moyen d'une seringue placée pour recueillir la solution du sol (figure 37). Le dispositif est placé dans l'étuve à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. La solution recueillie est acidifiée à 5% à l'acide nitrique.

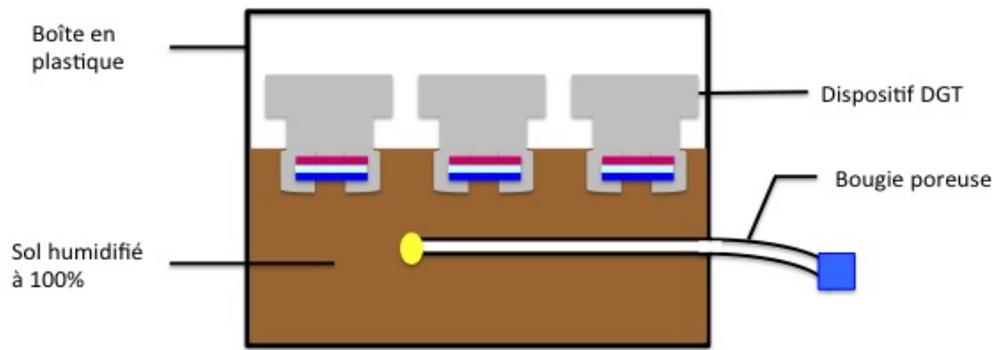


Figure 37: dispositif DGT et bougie poreuse pour évaluer la teneur en cuivre de la solution du sol, placés dans une boîte de 20 cm de longueur

Teneur en cuivre disponible mesuré par le dispositif DGT

Le capteur passif DGT (Diffusive Gradient in Thin film) permet de prélever en continu les éléments labiles et déterminer la fraction disponible du cuivre dans le sol ainsi que d'évaluer le flux de réalimentation.

Le dispositif est composé d'un support plastique où sont disposés successivement une résine Chelex (phase chélatante, considéré dans nos conditions expérimentales comme un puits infini), un gel de diffusion en polyacrylamide (contrôle du flux de cations par diffusion) et un filtre de 0,22 µM qui isole le gel des particules du sol (figure 38). Le dispositif DGT est mis en place à la surface de l'échantillon de sol dans la boîte plastique sur lequel on réalise également l'extraction à la bougie poreuse (figure 37).

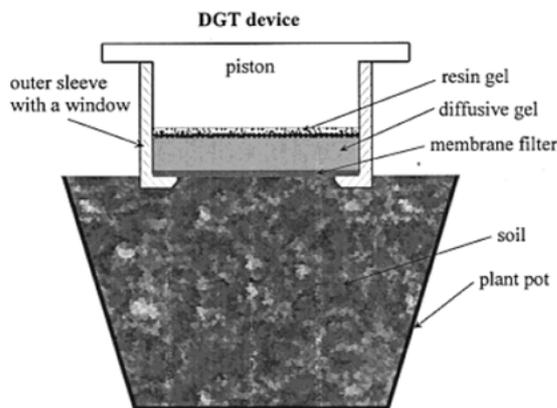


Figure 38: Capteur passif DGT (Zhang et al., 2001)

Trois dispositifs DGT sont installés par boîte afin de produire trois répétitions par sol. Le dispositif est placé dans une enceinte climatique programmée à 27°C pendant 48 heures. Le gel de résine est ensuite récolté et placé dans une solution de HNO₃ à 1 M pendant 24H pour désorber les ions fixés sur la résine. On conserve ensuite seulement la solution obtenue.

Le flux de cuivre (F) à travers le dispositif DGT est calculé par : $F = M/(A*t)$

Avec F = flux de forme labile de métal (en ng/cm²/s), M = masse de l'ion métallique accumulé sur la résine (en g), A = l'aire de la surface de gel exposée au sol (fixée à 3.14 cm²) et t = temps de pose du DGT (en s).

La concentration en cuivre labile de la solution (C) est ensuite obtenue par : $C = (F \cdot \Delta g) / D$
Avec C = concentration de métal labile dans la solution (en $\mu\text{g} \times \text{cm}^{-3}$), Δg = épaisseur de la couche de gel de diffusion (fixée à 0.093 cm), D = coefficient de diffusion de l'ion (dépend de la température du sol, en cm^2/s).

Dosage du cuivre

La teneur en cuivre total dans les minéralisats des échantillons de sol de la couche H1 a été dosée par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer PinAAcle 900T) à la flamme. Le cuivre dans la solution du sol de tous les échantillons de l'horizon H1 a été dosé par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer PinAAcle 900T) au four, quel que soit la méthode d'extraction ou de prélèvement utilisé (EDTA, bougie poreuse ou DGT). La déviation par rapport à l'échantillon standard de référence est inférieure à 10%.

Pour les couches H2 des 47 parcelles, et les horizons profonds jusqu'à 1 m de profondeur pour 3 parcelles P8, P14 et P28, les dosages du cuivre extrait à l'eau régale et le dosage du cuivre extrait à l'EDTA ont été réalisés par le laboratoire d'analyses des sols d'Arras en spectrométrie d'émission atomique à source plasma ICP-AES (inductively-coupled-plasma/atomic-emission-spectrometry) selon les normes ISO 11466/NF ISO 22036 et NF X 31-120/NF ISO 22036 respectivement.

Historique parcellaire

Des informations ont été recueillies auprès des chefs de culture des châteaux viticoles sur l'historique parcellaire de chaque propriété (quand les informations existaient), l'itinéraire cultural et le mode de production actuel à l'aide d'un questionnaire (joint en annexe). Lorsqu'il n'existait pas de traces de l'historique parcellaire ou qu'il était incomplet, celui-ci a été reconstitué approximativement à l'aide des photos aériennes disponibles sur Geoportail (<http://www.geoportail.gouv.fr/accueil>) (figure 39), les plus anciennes datant du début du 20^{ème} siècle.

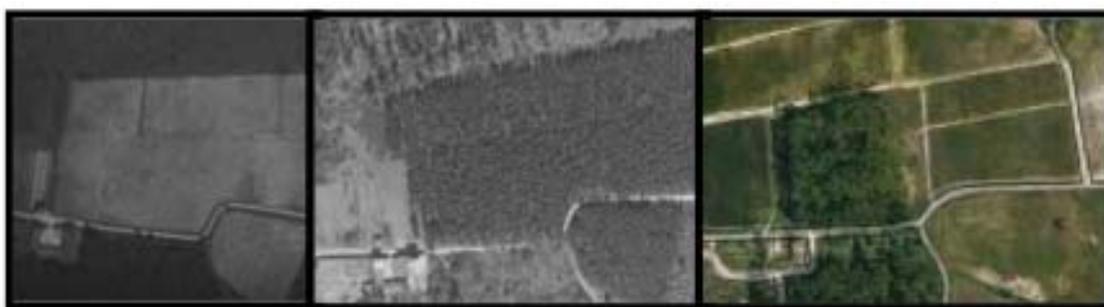


Figure 39: Exemple d'utilisation de photos aériennes de 1924-1956-2014 pour retracer l'historique d'une parcelle (géoportail.fr)

L'utilisation des photos aériennes, permet d'estimer le temps pendant lequel la parcelle a été cultivée en vigne et est donc susceptible d'avoir reçu des traitements à la bouillie bordelaise. Le pas de temps moyen entre deux photographies est d'une dizaine d'années.

Analyses statistiques

Les données excepté le pH, ont été standardisées par une transformation logarithmique, afin d'évaluer les relations entre plusieurs variables. Des analyses en composantes principales et des modèles de régression multilinéaire ont été utilisés pour évaluer les relations de la teneur en cuivre de la solution du sol ou de la teneur en cuivre disponible avec la teneur en cuivre total, en cuivre complexé (Cu EDTA), le et le pH, la CEC, la teneur en matières organiques (MO), en carbone total (C total), en azote total (N total), en carbone organique (C organique), en argile, en limon fin, en particules fines (limon fin + argile) et le rapport C/N (Carbone total/ azote total). Plusieurs modèles de régression multilinéaire ont ensuite été testés sur 3 variables dépendantes à l'aide de 4 groupes de variables explicatives. Les variables dépendantes sélectionnées sont log (Cu solution du sol), log (Cu disponible) et log (Cu solution du sol/Cu disponible). Chaque groupe est composé de variables corrélées entre elles. Le premier groupe de variable explicative est composé de log (Cu total) et log (Cu EDTA), le deuxième groupe du pH, le troisième groupe de log (N total), log (C total), log (C organique), log (MO) et log (C/N), et enfin le quatrième groupe de log (CEC), log (argile), log (particules fines) et log (limon fin). Chaque variable dépendante est régressée par une variable appartenant à chacun des groupes. Toutes les combinaisons sont testées. Le meilleur modèle est sélectionné à l'aide de la méthode pas à pas avec comme critère de sélection la minimisation du BIC (Bayesian Indicator Criteria). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 1.65.

2.2 Evaluation de la contamination en cuivre des sols viticoles de Pessac-Léognan

2.2.1 Résultats

2.2.1.1 Caractéristiques physico-chimiques des horizons H1 des sols étudiés de Pessac-Léognan

Les sols de la région de Pessac-Léognan sont majoritairement non carbonatés pourtant nous nous sommes attachés à choisir dans notre échantillonnage quelques sols carbonatés. Pour plus de 70% de nos parcelles, la teneur en CaCO_3 est inférieure à 1 g/kg MS. Pour le tiers restant, la teneur en calcaire totale est comprise entre 1,4 et 260 g/kg, avec une moyenne à 75,3 g/kg et une médiane à 34,8 g/kg. 10,6% des parcelles ont une teneur en calcaire totale supérieure à 100 g/kg.

La Capacité d'échange cationique est faible sur l'ensemble des sols étudiés. La valeur la plus basse pour nos parcelles est de $1,8 \text{ cmol}^+/\text{kg}$ alors que la plus élevée atteint $23 \text{ cmol}^+/\text{kg}$. La moyenne se situe à $7,1 \text{ cmol}^+/\text{kg}$ et la médiane à $5,4 \text{ cmol}^+/\text{kg}$. Les sols étudiés ont des valeurs de CEC faibles, majoritairement inférieures à $9 \text{ cmol}^+/\text{kg}$. Seules 15% des parcelles ont une CEC moyenne comprises entre 9 et $12 \text{ cmol}^+/\text{kg}$ et 10 % ont une CEC élevée, c'est à dire supérieure à $15 \text{ cmol}^+/\text{kg}$.

Texture du premier horizon des parcelles viticoles

Les sols de Graves se caractérisent par la présence de nombreux cailloux dont la taille est supérieure à 2mm et qui ne sont donc pas pris en compte dans le triangle de texture. Les sols étudiés se caractérisent par une forte proportion de sables (figure 40) allant de 39,5 à 90% avec une moyenne à 78,5 % et une médiane à 82,4%.

La teneur en argiles des parcelles viticoles est comprise entre 4,3 et 31,1 %, avec une moyenne de 10,8 % et une médiane de 7,5%. Les sols sont donc majoritairement sableux bien que quelques parcelles aient une texture plus argileuse (argilo-limono-sableux).

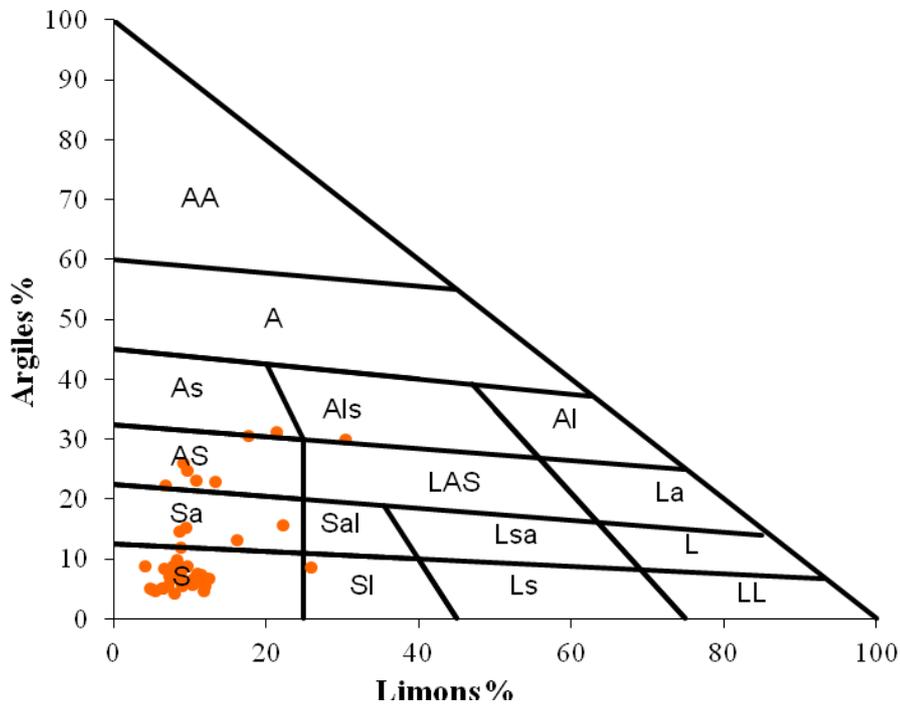


Figure 40: Répartition des 47 parcelles viticoles étudiées dans le triangle de texture GEPPA (d'après Baize, 1995) avec A ou a=argile, L ou l=limon et S ou s=sable et combinaison de lettres

pH du premier horizon des parcelles viticoles

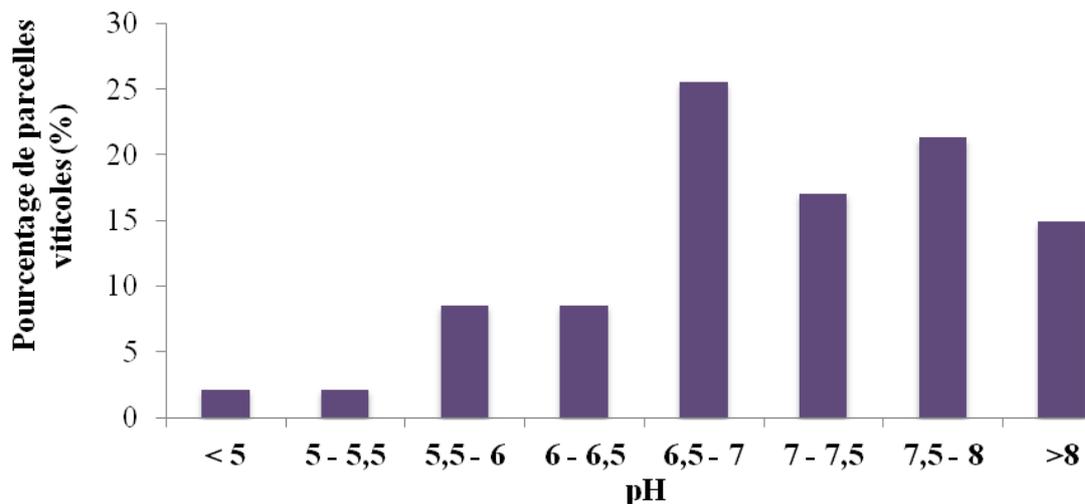


Figure 41: Répartition des parcelles étudiées en fonction de leur pH

Les sols des parcelles viticoles sont majoritairement neutres ou basiques (figure 41) : 42,5% ont des pH entre 6,5 et 7,5 et 36,2% ont un pH > 7,5. Quelques parcelles situées sur d'anciens sols forestiers sont particulièrement acides (2,1% ont un pH < 5).

Teneur en matières organiques du premier horizon des parcelles viticoles

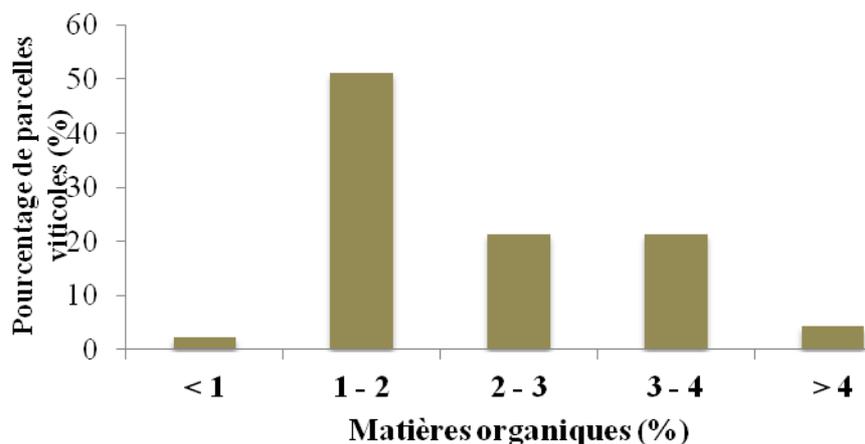


Figure 42: Répartition des parcelles étudiées en fonction de leur teneur en matières organiques (en % de matière sèche)

Les teneurs en matières organiques totales des sols viticoles sont comprises entre 0,9 et 8,2 % de matière sèche avec une moyenne à 2,3% et une médiane à 1,9%. La majorité des parcelles étudiées sont pauvres en matières organiques : 53% ont des teneurs en matières organiques inférieures à 2% et seulement 4% ont des teneurs élevées en matières organiques supérieures à 4% (figure 42).

2.2.1.2 Teneur en cuivre total des couches H1 et H2

Tableau 8: Teneur en cuivre total des couches H1 et H2 des parcelles viticoles étudiées

	Minimum (mg/kg)	Maximum (mg/kg)	Moyenne (mg/kg)	Médiane (mg/kg)	1 ^{er} décile (mg/kg)	9 ^{ème} décile (mg/kg)
H1 (0-20 cm)	1,4	383,3	105,2	89,3	15,4	220,3
H2 (20-40 cm)	3,7	306,0	93,7	65,9	7,1	191,0
Horizon de surface du RMQS (Gis Sol, 2011)	Inférieur à la limite de quantification	508	20,4	13,9	5,1	35,7

D'après le réseau de mesure de la qualité des sols (GIS Sol, 2011), la teneur en cuivre totale de l'horizon de surface des sols français se situe en moyenne à 20,4 mg/kg et en médiane à 13,9 mg/kg, sachant que la méthode de minéralisation utilisée est une minéralisation totale utilisant l'acide fluorhydrique, ce qui maximise les valeurs. Les sols étudiés sur l'appellation Pessac-Léognan ont des teneurs élevées, comme c'est le cas de la plupart des sols viticoles (tableau 8). Ainsi, 15% des parcelles ont des teneurs dix fois supérieures à la moyenne des sols français et seulement 15% de nos parcelles ont des teneurs inférieures à 20,4 mg Cu/kg pour la couche H1. La moyenne des teneurs en cuivre total de la couche H2 est légèrement plus faible (11% de moins) que celle de la couche H1.

Répartition du cuivre total en fonction de la profondeur

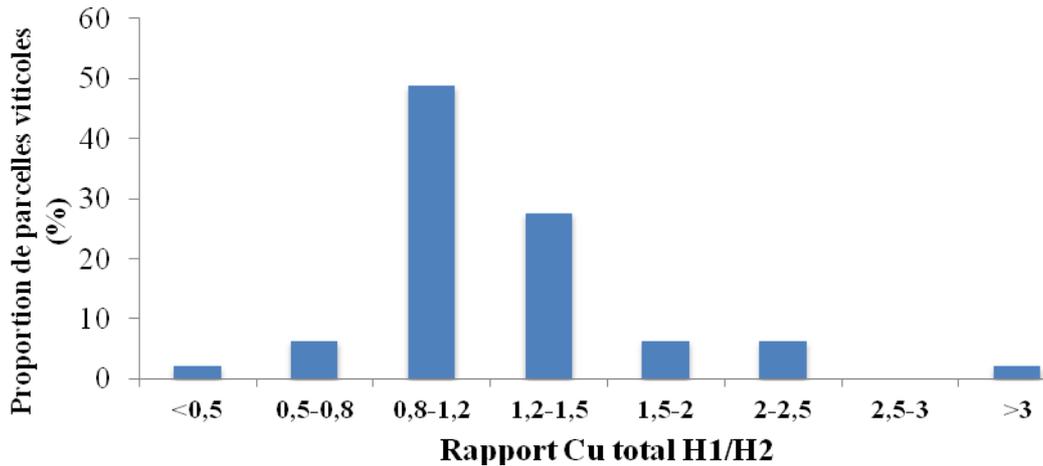


Figure 43: Répartition des parcelles viticoles en fonction du rapport de la teneur en cuivre total de l'horizon 1 sur la teneur en cuivre total de l'horizon 2

Nous avons comparé les concentrations totales dans les couches H1 (0-20 cm) et H2 (20-40 cm) et pour cela fait le rapport de concentration entre les deux profondeurs (figure 43). Plus de 48% des parcelles ont des teneurs en cuivre total similaires dans les couches H1 (0-20 cm) et H2 (20-40 cm), suggérant une homogénéisation du sol sur une profondeur supérieure ou égale à 40 cm. 8 % des parcelles ont des teneurs dans la couche de surface H1 au moins deux fois plus élevées que dans la couche H2 située en dessous. Au contraire, 2% des parcelles ont une teneur en cuivre deux fois plus élevée dans la couche profonde H2 que dans la couche de surface H1 (figure 43). Une seule parcelle de notre échantillonnage, en viticulture depuis 200 ans, n'a jamais été labourée. Sur cette parcelle, le rapport entre la couche de surface et la couche inférieure est supérieur à 3.

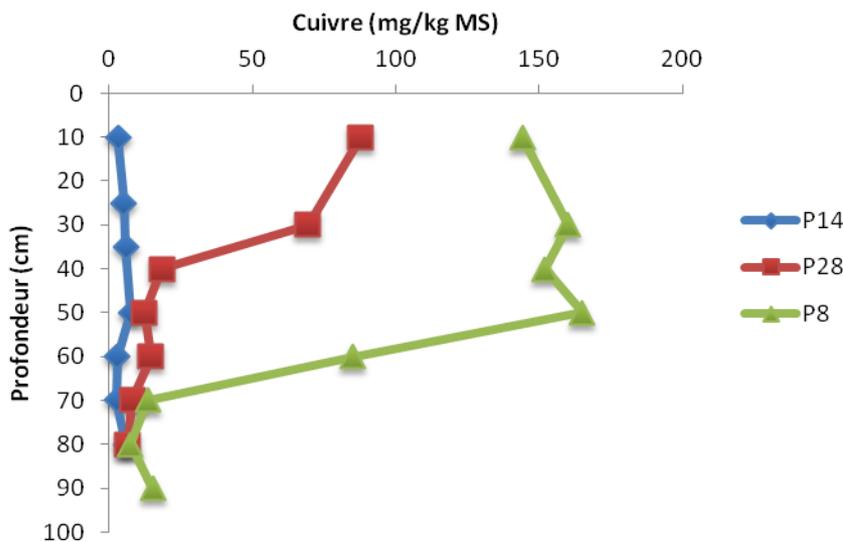


Figure 44: Evolution de la teneur en cuivre total dans le sol en fonction de la profondeur pour les parcelles P28, P14 et P8

Pour trois parcelles, P8, P14 et P28, nous avons mesuré la teneur en cuivre total tous les 10 cm jusqu'à 80 cm de profondeur minimum (figure 44). Pour la parcelle P8, les teneurs les plus élevées à 160 mg/kg environ se situent entre 30 et 60 cm de profondeur et non pas dans l'horizon de surface. Au-delà de 60 cm, cette teneur diminue brusquement jusqu'à 13,5

mg/kg. Cette parcelle est très intéressante car historiquement en viticulture depuis le début du XVIème siècle. Dans ce cas, il y a sûrement eu une redistribution de l'accumulation du cuivre entre les horizons, probablement suite à un labour plus profond après arrachage de la parcelle et enfouissement de la couche superficielle plus contaminée.

La teneur en cuivre total de la parcelle P28 évolue de 87,8 mg/kg pour la couche H1 à 69,4 mg/kg pour la couche H2 puis diminue brusquement à partir de 40 cm de profondeur jusqu'à atteindre 6 mg/kg pour le niveau le plus profond. Cette parcelle était en viticulture au début du XXème siècle puis elle a été plantée en pins à partir de la seconde guerre mondiale et enfin replantée en vigne il y a une dizaine d'années.

Enfin, la parcelle P14, la moins contaminée en cuivre des trois, se caractérise par une teneur en cuivre total de l'horizon de surface à 3,1 mg/kg qui se stabilise ensuite à 5 mg/kg environ pour les horizons suivants, la teneur en cuivre la plus élevée étant de 7,5 mg/kg pour l'horizon 50-60 cm. Cette dernière parcelle est en viticulture depuis environ 25 ans seulement.

Variabilité de la teneur en cuivre total des parcelles sur une exploitation viticole



Figure 45: Teneurs en cuivre total mesuré sur 11 parcelles d'un même domaine viticole

La teneur en cuivre total ne varie pas seulement en fonction de la profondeur mais également entre les parcelles d'une même exploitation viticole. Par exemple, nous avons mesuré la teneur en cuivre total de l'horizon de surface pour 11 parcelles situées sur un même domaine (figure 45). Les teneurs en cuivre total varient de 23 à 256 mg/kg, soit des teneurs au moins dix fois plus élevées sur certaines parcelles que sur d'autres. Ces parcelles ont été plantées en vigne dans les années 80 et sont toutes encore en production aujourd'hui, mais certaines avaient déjà été plantées en vigne antérieurement.

Nous avons pu reconstituer l'historique parcellaire grâce aux informations fournies par l'exploitant et à l'aide d'anciennes photos aériennes. Il apparaît que les teneurs en cuivre total les plus élevées (supérieures à 100 mg/kg) concernent des parcelles viticoles qui étaient en production au début du XXème siècle (zone I). Deux parcelles de la zone I mises en friches dans les années 60, présentent des teneurs un peu plus faibles (73 et 85 mg/kg). Sur les anciennes parcelles arboricoles de la zone III, les teneurs en cuivre total sont également importantes (62 et 113 mg/kg). Ceci peut s'expliquer par le fait que la bouillie bordelaise était

également utilisée en arboriculture. Ce sont les parcelles anciennement en prairie, en bois et en jachère (zone II et bordure de zone III) qui ont des teneurs en cuivre les plus faibles. La parcelle II 12 un temps en fermage auprès d'un autre château viticole, a été plantée en vigne un peu plus tôt que les autres parcelles de la zone II, ce qui explique que sa teneur soit un peu plus élevée (63 mg/kg).

Importance de l'historique parcellaire sur la teneur en cuivre totale des sols

L'historique parcellaire nous permet donc de comprendre en grande partie les différences de teneurs en cuivre total entre des parcelles viticoles. Nous avons pu reconstituer l'historique parcellaire des parcelles à partir des informations fournies par les châteaux concernés et à l'aide de photos aériennes. L'enregistrement des traitements effectués n'étant obligatoire que depuis un peu plus d'une dizaine d'années, nous n'avons que peu d'informations précises sur les doses et les fréquences des traitements cupriques apportés durant le XX^{ème} siècle sur une parcelle. Nous avons obtenu une corrélation significative entre le nombre d'années en usage viticole et la teneur en cuivre total du sol (figure 46). Toutefois, plus le nombre d'années augmente, plus la variabilité de la teneur en cuivre augmente entre les parcelles ayant connu la même durée de production en vigne.

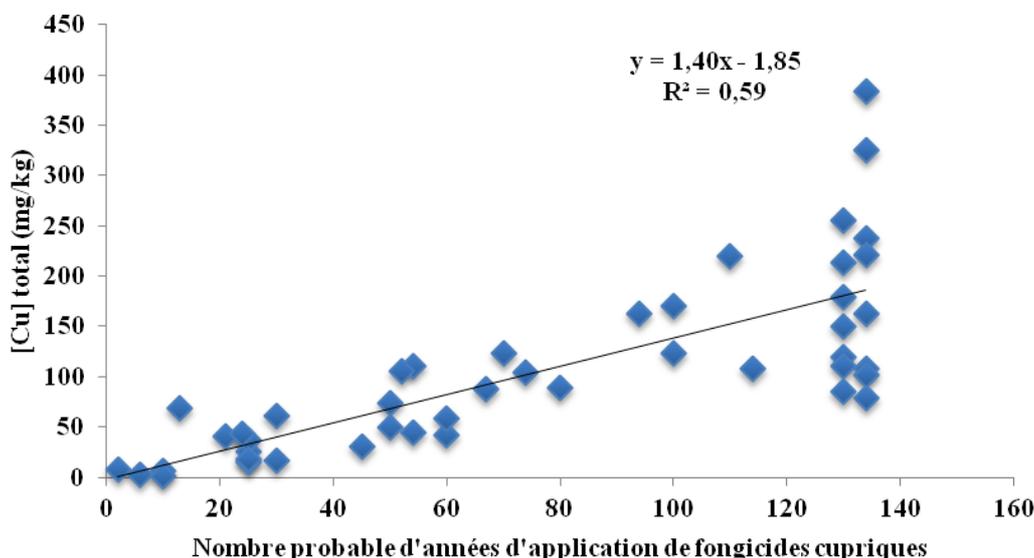


Figure 46: Relation entre la teneur en cuivre total de l'horizon 1 des parcelles viticoles et le nombre probable d'années d'application de fongicides cupriques

2.2.1.3 Principales caractéristiques expliquant la teneur en cuivre totale de l'horizon de surface

Nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP) afin de déterminer si certaines caractéristiques du sol pouvaient expliquer les différences de teneur en cuivre total entre les horizons de surface. Nous nous sommes d'abord intéressés aux « jeunes » parcelles ayant connu moins de 110 ans de viticulture. Pour ces parcelles, la teneur en cuivre total est fortement liée au nombre d'années estimées d'applications des traitements. 69% de la variabilité entre les parcelles sont expliqués par les axes 1 et 2 de l'ACP (figure 47). L'axe 1 concerne surtout les caractéristiques physico-chimiques du sol (CEC puis dans une moindre mesure argiles et calcaire total) tandis que l'axe 2 concerne davantage la matière organique.

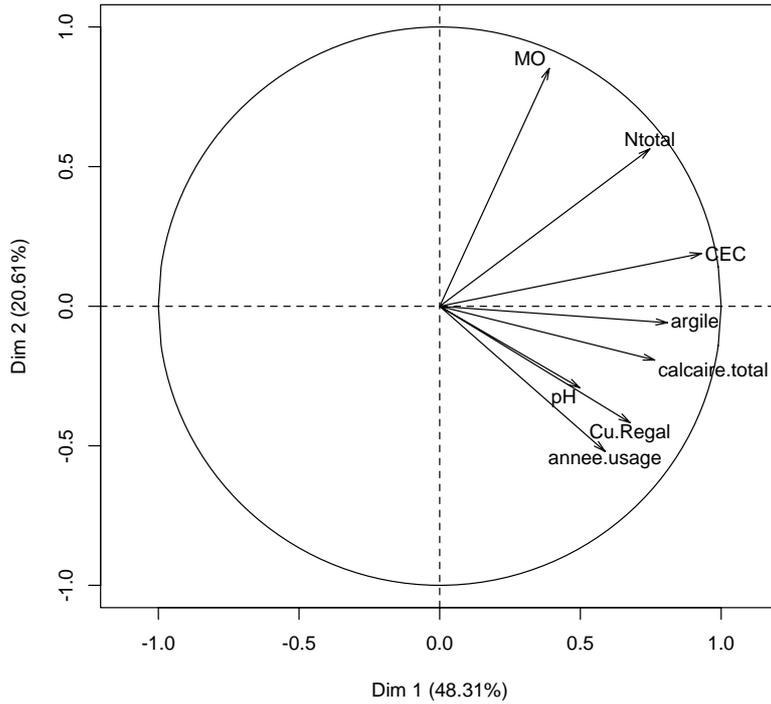


Figure 47 : Analyses en composantes principales des caractéristiques du sol de l'horizon 1 pour des parcelles en viticulture depuis moins de 130 ans

Conformément à ce que nous attendions, la teneur en cuivre total des parcelles ayant connu moins de 130 ans de viticulture, est fortement corrélée à l'usage des fongicides cupriques puisque nous obtenons un coefficient de corrélation de 0,7 (figure 48). Connaissant l'historique d'une parcelle, nous pouvons donc estimer la teneur en cuivre par la relation suivante :

$$[\text{Cu}]_{\text{sol}} = 1,35xN, (p < 0.0001) \text{ avec } N \text{ le nombre d'années en usage viticole}$$

Cette concentration est la résultante des apports cumulés et des exports via la lixiviation ou le lessivage. Cela confirme que le sol est bien un compartiment accumulateur pour le cuivre.

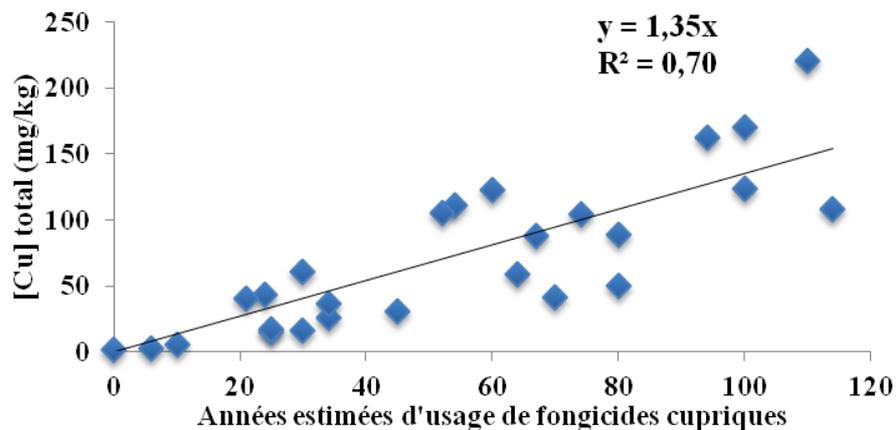


Figure 48: Relation entre la teneur en cuivre total et le nombre d'années estimé d'usage viticole pour des parcelles en viticulture depuis moins de 130 ans

Les parcelles ayant connus plus de 130 ans de viticulture ont connu une période avant l'usage de la bouillie bordelaise pour lutter contre le mildiou, puis toute la période d'usage de la bouillie bordelaise, de sa création à aujourd'hui.

Pour les parcelles ‘anciennes’ ayant connu 130 ans de viticulture au moins, l’ACP nous montre que la variabilité entre les parcelles s’explique à 73% par les axes 1 et 2 (figure 49). L’axe 1 concerne surtout les caractéristiques physico-chimiques du sol (CEC, argiles, calcaire total et pH) tandis que l’axe 2 concerne davantage la matière organique, l’azote total qui sont corrélés à la teneur en cuivre total. La teneur en cuivre total de ces parcelles est donc surtout liée à la teneur en matières organiques. Les années d’applications influencent moins la teneur en cuivre total.

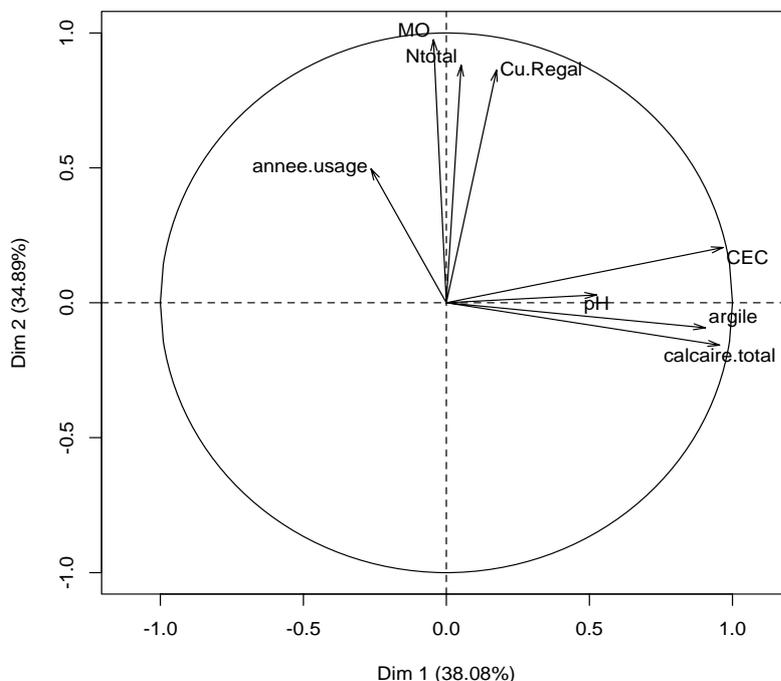


Figure 49: Analyses en composantes principales des caractéristiques du sol de l’horizon 1 pour des parcelles en viticulture depuis plus de 130 ans

Bien que la teneur en matières organiques apparaisse comme le facteur expliquant le mieux la teneur en cuivre total, le coefficient de corrélation n’est que de 0,27 ce qui montre que pour des vieux vignobles, le processus d’accumulation du cuivre dans le premier horizon est plus complexe (figure 50).

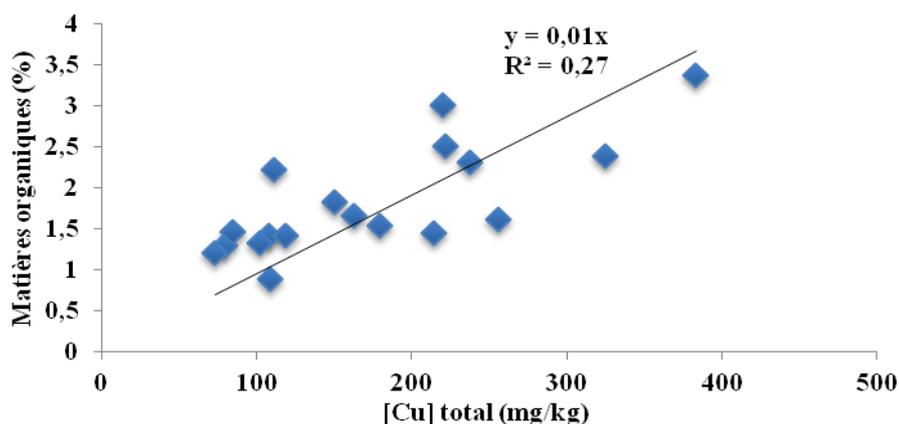


Figure 50: Influence de la teneur en matières organiques sur la teneur en cuivre total des parcelles en viticulture depuis au moins 130 ans

2.2.2 Discussion

Nous avons montré que les teneurs en cuivre total des parcelles viticoles de Pessac-Léognan sont élevées par rapport à la teneur en cuivre moyenne des sols viticoles français. Pourtant, les teneurs en cuivre total de ces sols se situent légèrement en dessous de celles mesurées dans la région bordelaise par Jacobson et al. (2005) et par El Hadri et al. (2012). Les teneurs minimum sont parmi les plus faibles tandis que la teneur maximale observée sur les parcelles de cette zone dépasse celles des parcelles situées en Bourgogne, dans la vallée du Rhône, dans le Beaujolais mais aussi dans la vallée de la Loire ou en Midi-Pyrénées (Delas, 1963, Flores-Vélez, 1996, Regourd, 2000, Besnard et al., 2001, Parat et al., 2002, Chaignon et al., 2003, Jacobson et al., 2005). Le climat océanique, doux et humide, de la région bordelaise est favorable au développement du mildiou, ce qui explique le recours fréquent aux fongicides cupriques dans cette région. Les autres pays européens ayant également une tradition viticole ancienne ont des teneurs en cuivre plus élevées qu'en Pessac-Léognan, comme l'Espagne, le Portugal ou l'Italie (Deluisa et al., 1996, Arias et al., 2005, Cattani et al., 2006, Fernandez-Calvino et al., 2008, Mackie et al., 2012).

Nos résultats montrent qu'il existe de grandes disparités entre les parcelles, même au sein d'une même exploitation viticole. Aujourd'hui, la viticulture de précision permet d'adapter le traitement des pesticides à chaque parcelle, voire à chaque cep mais, autrefois, le même itinéraire cultural était appliqué sur toutes les parcelles de l'exploitation. Les différences observées au sein d'une même exploitation témoignent donc de l'historique parcellaire plus que de différences d'applications de fongicides. Les parcelles destinées à la viticulture depuis longtemps sont ainsi souvent les plus contaminées. Toutefois, dans le cas d'anciennes parcelles arboricoles, la teneur en cuivre totale est également importante car ce type de production nécessite également l'utilisation de fongicide cuprique, souvent plus qu'en vignoble. Paradoxalement, certaines parcelles récemment plantées en vigne sur d'anciens sols forestiers ont présenté des teneurs en cuivre élevées. Nos recherches à l'aide des photos aériennes nous ont permis de comprendre pourquoi : si ces parcelles apparaissent bien recouvertes de pins dans les années 50, elles étaient en revanche cultivées en vigne dans les années 20. Le cuivre mesuré aujourd'hui date alors en grande partie du début du XX^{ème} siècle. Considérer la date de la dernière mise en viticulture de la parcelle ne suffit donc pas pour évaluer l'historique parcellaire. Et il faut donc considérer l'historique sur des temps longs. A l'inverse, une fois une relation établie pour une petite région, il est alors possible de relier la teneur totale et la durée d'usage viticole, et ainsi utiliser le cuivre pour délimiter un parcellaire ancien. Les teneurs en cuivre total et en d'autres métaux comme le plomb sont d'ailleurs utilisés en archéologie pour comprendre l'usage de certains sols à l'âge de bronze (Elberling et al., 2010).

Il existe également une grande variabilité des teneurs en cuivre total entre des parcelles très âgées. Cela s'explique d'une part par les différences de pratiques en fonction des viticulteurs mais également par l'évolution de la réglementation concernant l'usage des pesticides. L'usage des pesticides n'était pas réglementé au début du XX^{ème} siècle, chaque viticulteur dosait lui-même ses traitements sans réglementation alors qu'aujourd'hui la réglementation est beaucoup plus stricte avec un maximum de 6 kg/ha/an lissé sur 5 ans. Ainsi la différence d'apport entre deux exploitants n'est aujourd'hui que de 6 kg/ha quand elle pouvait atteindre 30kg chaque année au début du XX^{ème} siècle (Branas, 1984). De plus, nous n'avons qu'estimé le nombre d'années en usage viticole à une dizaine d'années près. Or, davantage de photos aériennes sont prises aujourd'hui qu'il y a un siècle, notre marge d'erreur d'estimation est donc plus importante sur les vieux vignobles que sur les vignobles récents.

Les parcelles que nous avons étudiées ont des textures très majoritairement sableuses avec une faible capacité d'échange cationique et une teneur en matière organique faible. Ces caractéristiques physico-chimiques sont favorables à la mobilité du cuivre. Notre étude montre que la teneur en cuivre total des sols est surtout élevée dans les couches de surface du sol, suggérant une faible migration du cuivre vers la profondeur, par des phénomènes de lessivage ou de lixiviation. Plusieurs études ont déjà montré que la teneur en cuivre est plus élevée dans les premiers horizons puis décroît en profondeur à partir de 15 ou 30 cm selon Brun et al (1998), à partir de 20 ou 40 cm (Komarek et al., 2008).

Nos résultats montrent une contamination en cuivre plus en profondeur (60 cm) pour certaines parcelles. Dans ce cas, il s'agit généralement de sols profondément remaniés par le travail du sol. Ce sont donc les techniques de travail du sol utilisées qui conditionnent davantage cette répartition du cuivre entre les horizons que la texture ou les propriétés physico-chimiques du sol comme le suggérait déjà Brun et al. (1998). Ainsi les parcelles qui ont des teneurs similaires entre les horizons 1 et 2 sont des parcelles sur lesquelles un labour est régulièrement pratiqué (Provenzano et al., 2010). Celles dont les teneurs sont plus élevées sur l'horizon 1, ne subissent un travail du sol que très superficiel, voire inexistant. Par exemple, la parcelle qui présente une teneur en cuivre 3 fois plus élevée dans l'horizon 1 que dans l'horizon 2 n'a jamais été labourée durant les 200 dernières années. A l'inverse, une distribution inversée entre les horizons avec des teneurs en cuivre deux fois moins élevées dans la couche de surface que dans les horizons plus profonds (jusqu'à 60 cm) caractérisent des parcelles dont le sol a été profondément remanié, probablement suite à cause d'un labour profond après l'arrachage de la vigne (Brun et al., 1998 ; Mirlean et al., 2007, Bravin, 2008). Si la technique du labour permet de diminuer la teneur en cuivre de l'horizon de surface à court terme, cela peut poser davantage de difficultés de reprise des jeunes vignes. En effet, les racines de jeunes vignes, plus sensibles à la rhizotoxicité cuprique, mettent davantage de temps à atteindre les horizons les moins contaminés (Coïc et Coppenet, 1989).

Depuis les années 1960, de nombreuses études ont montré que le cuivre migre peu en profondeur car il se complexe rapidement à la matière organique, notamment dans les vieux vignobles dont la teneur en matières organiques est plus élevée que celles des jeunes parcelles viticoles (Delas, 1963, Brun et al., 1998, Pietrzak et McPhail, 2004). Nos résultats montrent que, bien que la teneur en matière organiques de plus de la moitié de nos parcelles soit faible, elle explique en grande partie la teneur en cuivre total mesurée dans les anciens vignobles. D'ailleurs seulement 37% des anciennes parcelles ont une teneur en matières organiques supérieure à 2%. Contrairement à ce que Pietrzak et Mcpahail (2004) ont observé, les vignobles anciens ne sont pas plus riches en matières organiques que les jeunes vignobles, pour deux raisons principalement : d'une part, la plupart des parcelles récemment plantées en vigne sont d'anciennes parcelles forestières qui se caractérisent par une teneur en matières

organiques élevée. D'autre part, une teneur en matières organiques peu élevée est davantage recherchée par les viticulteurs afin de limiter la vigueur de la vigne et de favoriser davantage la qualité du raisin que le développement foliaire.

Fernandez-Calvino et al., (2008) ont montré que le cuivre était principalement complexé à la matière organique ou aux colloïdes inorganiques dans les vignobles anciens. Comme la teneur en matière organique est plutôt faible, il est possible que la proportion de cuivre complexée aux colloïdes inorganique soit importante dans ces sols mais nous ne l'avons pas vérifié. Il serait intéressant d'effectuer des mesures de cette fraction de cuivre dans le sol sur nos échantillons en suivant le même protocole que Fernandez-Calvino et al. (2008).

Nous avons mis en évidence dans cette partie que la teneur en cuivre total de nos parcelles dépend fortement de l'usage des fongicides cupriques, sur les parcelles, notamment les applications effectuées sur les vignobles les plus anciens. Il est nécessaire de bien connaître l'historique parcellaire puisque la destination la plus récente de la parcelle ne reflète pas la teneur en cuivre total ayant pu être accumulé antérieurement. La connaissance des pratiques culturales et notamment du travail du sol est nécessaire pour connaître les horizons dans lesquels la teneur en cuivre total est la plus élevée puisque dans certains cas, l'horizon de surface n'est pas l'horizon le plus contaminé. Compte tenu des risques de phytotoxicité lié au cuivre, il serait intéressant pour les exploitants agricoles de vérifier si les teneurs présentes dans leur sol sont compatibles avec la culture qu'il envisagent sur ces parcelles que ce soit pour des parcelles destinées à la viticulture, ou à des parcelles destinées à d'autres cultures plus sensibles au cuivre comme le blé, l'orge ou la tomate. Toutefois, la teneur en cuivre total ne reflète pas toujours la teneur en cuivre disponible pour la vigne, c'est pourquoi nous allons maintenant nous intéresser aux autres fractions de cuivre dans le sol.

2.3 Détermination de la disponibilité en cuivre de l'horizon de surface des parcelles viticoles de Pessac-Léognan

2.3.1 Résultats

2.3.1.1 Teneur en cuivre mobile des sols viticoles de Pessac-Léognan (extrait à l'EDTA)

La teneur en cuivre extraite à l'EDTA correspond à la fraction complexée assimilable à un compartiment mobile du cuivre dans le sol. Dans nos parcelles, il y a une très forte corrélation ($R^2 > 0,9$) de la teneur en cuivre extrait à l'EDTA avec la teneur en cuivre total, que ce soit pour les couches H1 ou H2 (figure 51). Le cuivre présent dans les parcelles viticoles est très majoritairement mobile à 65%.

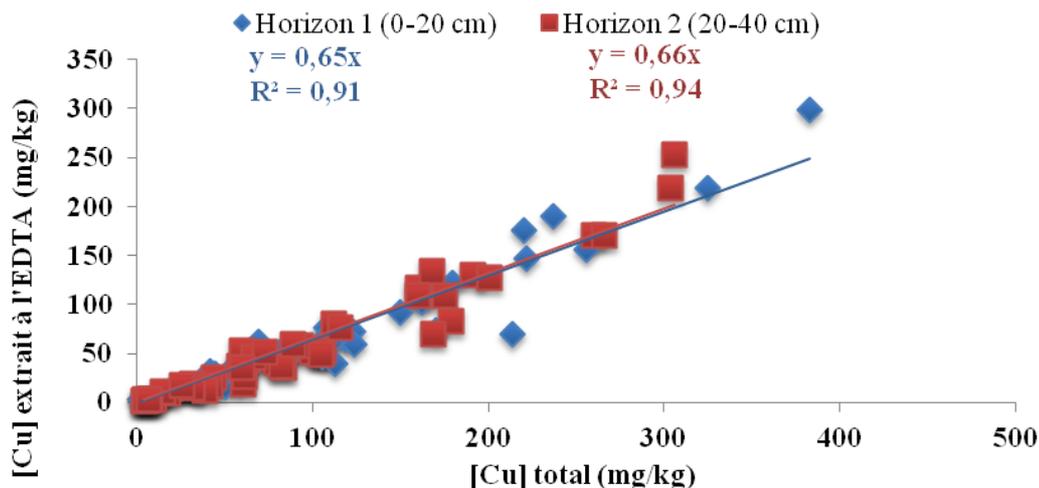


Figure 51: Relation entre la teneur en cuivre extrait à l'EDTA et la teneur en cuivre total pour les horizons 1 (0-10 cm) et 2 (20-40 cm) des parcelles viticoles étudiées

Comme les relations entre le cuivre extrait à l'EDTA et la teneur en cuivre total sont similaires dans les couches H1 et H2, nous choisissons pour la suite d'étudier les relations entre les différentes fractions du sol seulement dans la couche H1.

2.3.1.2 Teneur en cuivre dans la solution du sol

Les concentrations de cuivre total mesurées dans la solution du sol (tableau 9) varient d'un facteur 65 entre les sols les moins et les plus contaminés, avec une concentration moyenne de 2,1 $\mu\text{mol/l}$.

Tableau 9: Concentrations dans la solution du sol et concentrations DGT dans les couches H1 des parcelles viticoles

	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane
Solution du sol ($\mu\text{mol/l}$)	0,12	7,5	2,1	1,6
Concentration DGT ($\mu\text{mol/l}$)	0,03	2,6	0,59	0,41

Une analyse en composantes principales a été réalisée pour la teneur en cuivre de la solution du sol, en incluant la teneur en cuivre total, la teneur en cuivre complexé et plusieurs paramètres du sol comme le pH, la CEC, les teneurs en matières organiques, en calcaire total, en carbone total, en azote total, en argile et en limon fin (figure 52). Les axes 1 et 2 expliquent 65% de la variabilité des parcelles. Selon l'axe 1, ses variabilités sont dues à la CEC, au carbone total, à l'azote total et à l'argile. La CEC et l'argile sont en partie corrélées entre elles. Les variabilités selon l'axe 2 sont davantage imputables à la teneur en cuivre total corrélée à la teneur en cuivre complexé.

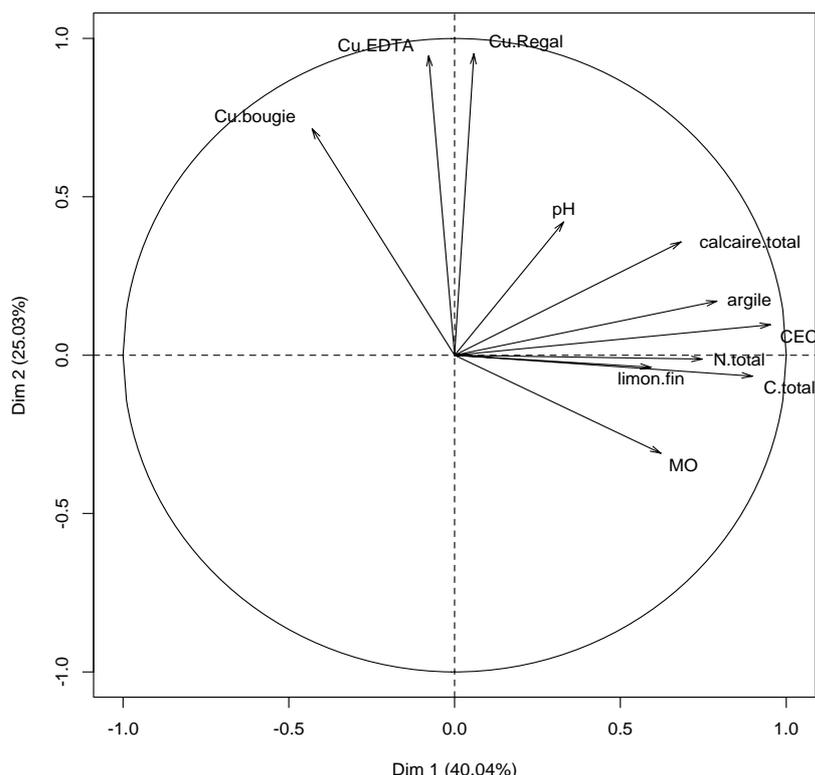


Figure 52: Analyse en composantes principales effectuée en incluant les teneurs en cuivre total (Cu Regal), en cuivre complexé (Cu EDTA) en cuivre de la solution du sol (Cu bougie) ainsi que des paramètres du sol mesurés pH, capacité d'échange cationique (CEC), teneurs en calcaire total, en argile, en limon fin, en azote total (N total), en carbone total (C total), en matières organiques (MO) pour 47 parcelles viticoles

Le meilleur modèle de régression multilinéaire a mis en évidence une relation forte de la concentration en cuivre de la solution du sol avec la concentration en cuivre EDTA, et le pH puis dans une moindre mesure avec la teneur en argile, et la teneur en matières organiques ($R^2=0,74$ et $p=1,25 \cdot 10^{-11}$). Les coefficients de corrélation sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Coefficients de corrélation linéaire entre la teneur en cuivre de la solution du sol, la teneur en cuivre complexé (Cu EDTA), la teneur en argile, le pH et la teneur en matières organiques (MO). * et * indiquent des corrélations significatives avec des probabilités $p < 0,05$ et $p < 0,001$ respectivement**

	Estimation	Erreur standard	t value	Probabilité
Intercept	3,1548	0,3762	8,39	$2 \cdot 10^{-10}$ ***
Log (Cu EDTA)	0,6092	0,0635	9,59	$5 \cdot 10^{-12}$ ***
Log (argile)	-0,3047	0,1370	-2,22	0,03167 *
pH	-0,1478	0,0384	-3,85	0,00041 ***
Log (MO)	-0,3965	0,1597	-2,48	0,01722 *

Nous pouvons en déduire une relation numérique permettant de calculer le teneur en cuivre de la solution du sol :

$$\text{Log (teneur en cuivre dans la solution du sol)} = 3,15 + 0,61 \times \text{log (teneur en cuivre EDTA du sol)} - 0,30 \times \text{log (teneur en argiles)} - 0,39 \times \text{log (teneur en matières organiques)} - 0,15 \times \text{pH}.$$

Nous avons ensuite vérifié la validité de cette formule en comparant les valeurs calculées aux valeurs mesurées dans les 47 parcelles de la teneur en cuivre de la solution du sol. Nous obtenons une régression linéaire qui nous permet de valider notre modèle (figure 53).

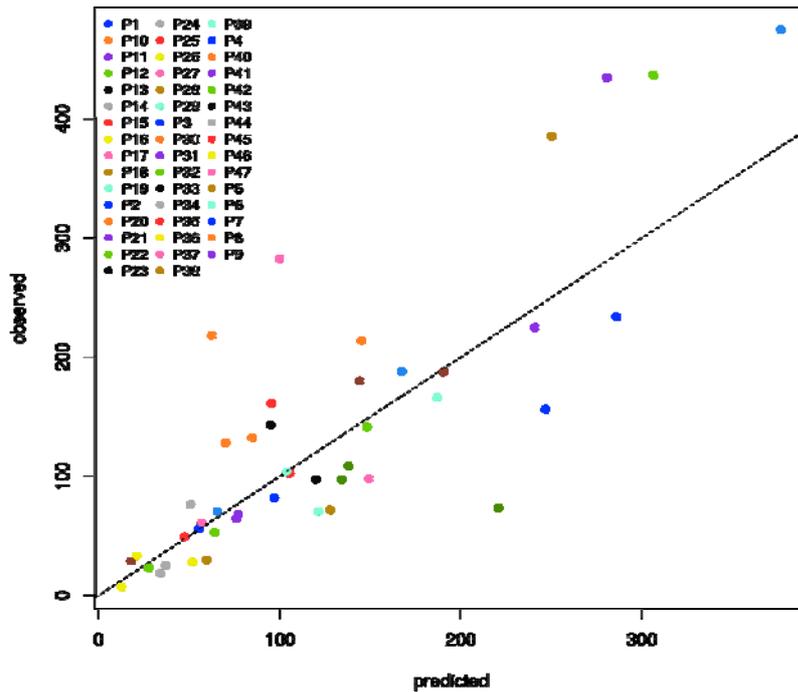


Figure 53: Corrélation entre les teneurs en cuivre de la solution du sol mesurées (observed) et calculées (predicted) pour 47 parcelles viticoles

2.3.1.3 Concentration en cuivre disponible mesuré par le capteur passif DGT

Une analyse en composantes principales a été réalisée pour la teneur en cuivre disponible mesurée par DGT, en incluant la teneur en cuivre total, la teneur en cuivre complexé et plusieurs paramètres du sol comme le pH, la CEC, les teneurs en matières organiques, en calcaire total, en carbone total, en azote total, en argile et en limon fin (figure 54). Les axes 1 et 2 expliquent 67% de la variabilité des parcelles. Les variabilités des axes 1 et 2 sont expliquées de la même façon que pour l'ACP précédente (figure 52).

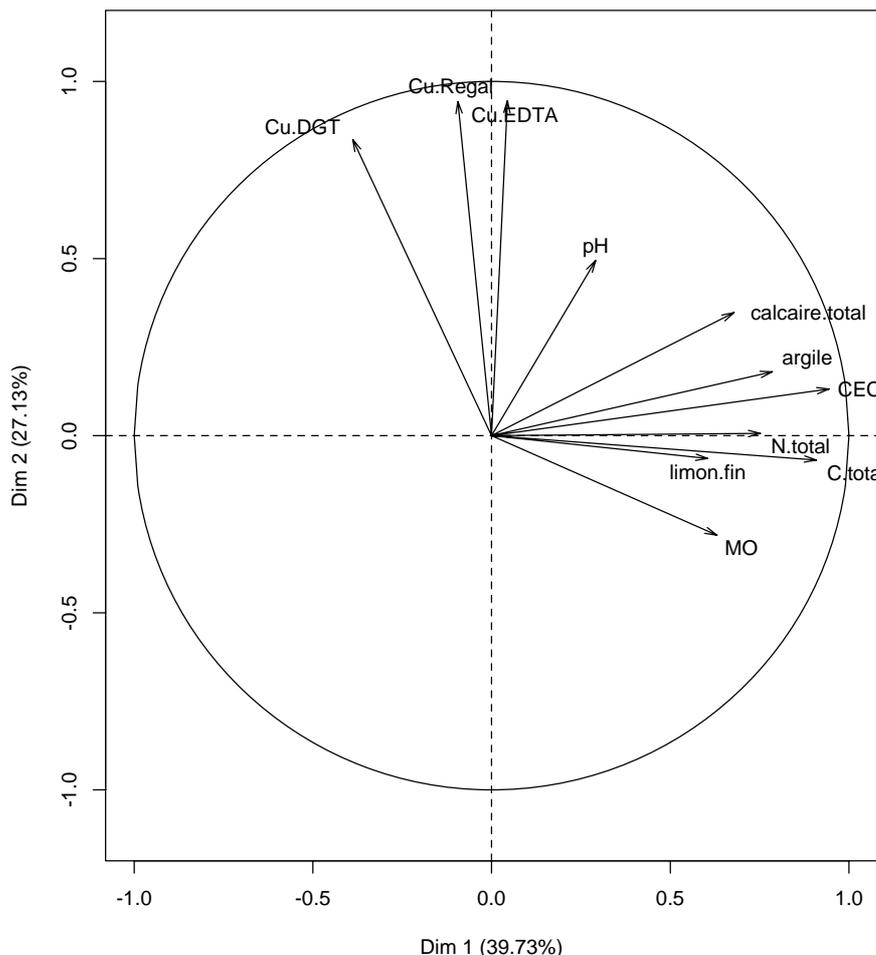


Figure 54: Analyse en composantes principales effectuée en incluant les teneurs en cuivre total (Cu Regal), en cuivre complexé (Cu EDTA) en cuivre disponible (Cu DGT) ainsi que des paramètres du sol mesurés pH, capacité d'échange cationique (CEC), teneurs en calcaire total, en argile, en limon fin, en azote total (N total), en carbone total (C total), en matières organiques (MO) pour 47 parcelles viticoles

Le meilleur modèle de régression multilinéaire a mis en évidence une relation forte de la teneur en cuivre de la solution du sol avec la teneur en cuivre EDTA puis dans une moindre mesure avec la teneur en Carbone total, et la teneur en particules fines (argiles + limons fins) ($R^2=0,85$ et $p=2 \cdot 10^{-16}$). Les coefficients de corrélation sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11: Coefficients de corrélation linéaire entre la teneur en cuivre disponible mesuré par DGT, la teneur en cuivre complexé (Cu EDTA), la teneur en particules fines (argile + limon fin) et la teneur en carbone total. * et *** indiquent des corrélations significatives avec des probabilités $p < 0,05$ et $p < 0,001$ respectivement

	Estimation	Erreur standard	t value	probabilité
Intercept	1,3296	0,3360	3,96	0,00029 ***
Log (Cu EDTA)	0,8244	0,0586	14,06	< 2 10^{-16} ***
Log (particules fines)	-0,3885	0,1863	-2,09	0,04315 *
Log (Carbone total)	-0,3903	0,1585	-2,46	0,01798 *

Nous pouvons en déduire une relation numérique permettant de calculer le teneur en cuivre de la solution du sol :

$$\text{Log (teneur en cuivre disponible mesuré par DGT)} = 1,33 + 0,82 \times \text{log (teneur en cuivre EDTA du sol)} - 0,39 \times \text{log (teneur en argiles + limons fins)} - 0,39 \text{log (teneur en carbone total)}.$$

Nous avons ensuite vérifié la validité de cette formule en comparant les valeurs calculées aux valeurs mesurées dans les 47 parcelles de la teneur en cuivre de la solution du sol. Nous obtenons une régression linéaire qui nous permet de valider notre modèle (figure 55).

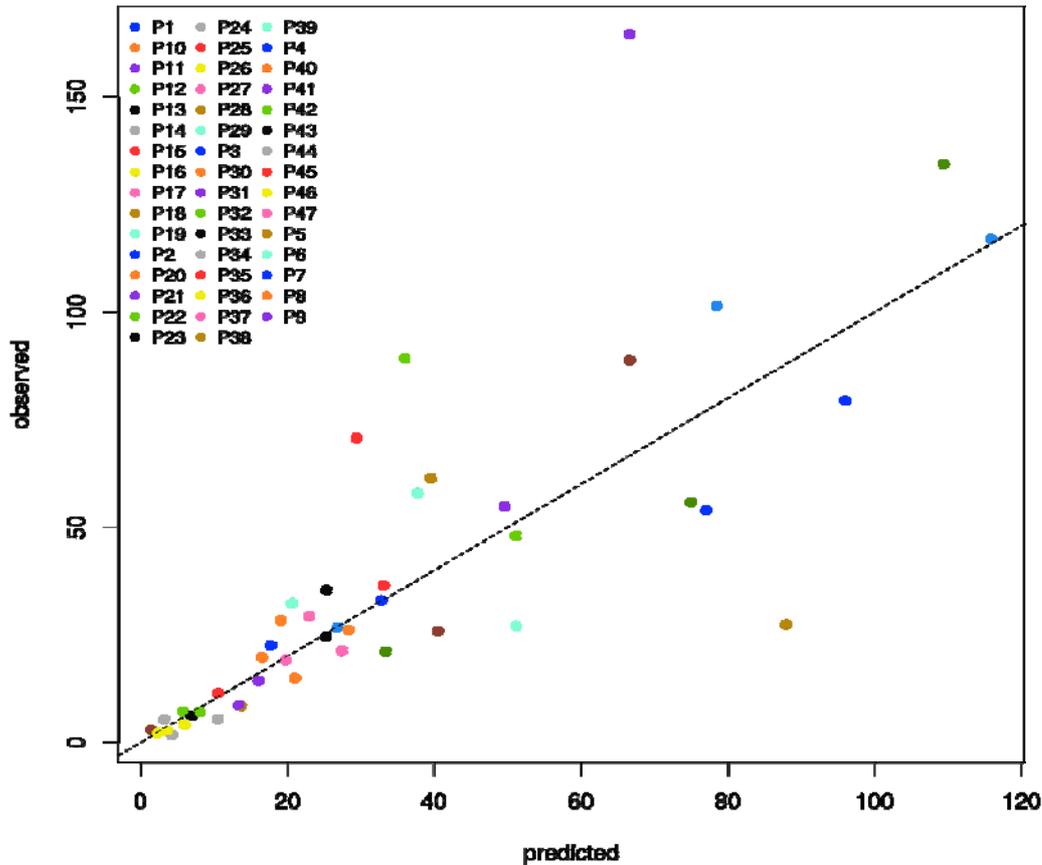


Figure 55: Corrélation entre les teneurs en cuivre disponible mesurées par DGT (observed) et calculées (prédictees) pour 47 parcelles viticoles

2.3.2 Discussion

Nous avons montré que la teneur en cuivre extrait à l'EDTA est très fortement corrélée à la teneur en cuivre total dans les sols étudiés. D'autres études vont dans ce sens, qui ont également mesuré une corrélation de l'ordre de 0,9 entre le cuivre extrait à l'EDTA et le cuivre total dans les sols viticoles (Brun et al., 1998, Fernandez-Calvino et al., 2008). Le cuivre apporté en tant que fongicide sur les parcelles viticoles reste donc majoritairement mobile et donc mobilisable dans le compartiment solide du sol, quelle que soit l'ancienneté des vignobles (El Azzi et al., 2013). Comme la fraction de cuivre complexé du sol est assez mobile, cela explique qu'elle influence à la fois la teneur en cuivre disponible instantané de la solution du sol mais aussi la réalimentation de la solution du sol en cuivre.

Plusieurs études ont précédemment mis en évidence une relation forte entre la teneur en cuivre complexé et la teneur en matières organiques (Sauve et al., 1997, Baize et al., 2006, Wightwick et al., 2010, El azzi et al., 2013). Grâce à des techniques isotopiques, El Azzi et al. (2013) ont montré que c'est surtout le cuivre d'origine anthropique apporté lors des traitements fongicides qui se lie fortement à la matière organique. Le cuivre d'origine géochimique présentant plutôt des affinités avec les oxydes et les hydroxydes ou étant inclus dans les minéraux, correspondant à la fraction résiduelle après extractions sélectives ou séquentielles (El azzi et al., 2013). Outre l'origine anthropique, le facteur temps semble également jouer en faveur de la fraction de cuivre liée à la matière organique. Nos résultats montrent une relation forte entre la concentration en cuivre disponible mesuré par DGT et la teneur en cuivre EDTA fortement liée à la matière organique. D'autres articles ont également montré que plus le vignoble est ancien, plus le cuivre se lie à la matière organique, et particulièrement si les teneurs en cuivre total sont élevées (Sauvé et al., 1997, Fernandez-Calvino et al., 2008). Il semble que les teneurs en cuivre élevées dans les sols perturbent les micro-organismes du sol, ce qui ralentit le processus de minéralisation et de fait entraîne une accumulation de la matière organique (Parat et al., 2002, Andreazza et al., 2010, Mackie et al., 2012). Pourtant un autre étude suggère que le cuivre devient de moins en moins disponible avec le temps (Rusjan et al., 2007). Cela s'expliquerait par une augmentation progressive de la CEC à cause de l'augmentation de la teneur de matières organiques suite à l'incorporation de matières végétales fraîches (Mackie et al., 2012). Nous n'observons pas ce phénomène, probablement parce que le taux d'argiles et la CEC sur nos parcelles sont faibles, ce qui limite ce phénomène de diminution de disponibilité du cuivre. De plus, des traitements cupriques continuent d'être effectués sur les parcelles que nous avons étudié, ce qui pourrait masquer ce phénomène de diminution de la disponibilité du cuivre.

Nos résultats montrent que la matière organique a un effet sur les équilibres sol-solution et donc la concentration de cuivre en solution, mais aussi sur la réalimentation de cette solution par le compartiment solide du sol lorsque la concentration en solution s'abaisse. Dans les deux cas, la matière organique a un effet limitant la concentration disponible. Nos résultats montrent que le pH semble n'avoir d'influence que sur la concentration en solution et pas sur la réalimentation de cette solution. Cette influence est négative : plus le pH augmente, plus la concentration en solution diminue. D'autres auteurs ont montré précédemment une corrélation négative entre le cuivre disponible et le pH, surtout si le pH diminue (Brun et al., 1998, Fernandez-Calvino et al., 2012). Il semble que la disponibilité du cuivre change peu lorsque le pH augmente à cause des carbonates souvent présent dans les sols alcalins (Duplay et al., 2014). Ce serait davantage la modification du pH que la valeur du pH elle-même qui explique l'influence de ce facteur sur la solution du sol plutôt que sur sa réalimentation. Comme la rhizosphère et les activités des micro-organismes du sol peuvent modifier localement le pH du sol, c'est un facteur important pouvant conditionner la biodisponibilité du cuivre. Les micro-organismes du sol n'ont toutefois pas été étudiés au cours de cette thèse.

Dans ce chapitre, nous avons montré que la teneur en cuivre total et la teneur en cuivre complexé donc potentiellement mobile augmentent avec le nombre d'années d'usage en viticulture. Une bonne connaissance de l'historique parcellaire et des pratiques culturales antérieures sont nécessaires pour évaluer quels sont les horizons les plus contaminés dans un sol viticole et pour lesquels il sera nécessaire de connaître la teneur en cuivre potentiellement mobile. La teneur en matières organiques est un facteur prépondérant expliquant la sorption du cuivre et limitant la réalimentation de la solution du sol en cuivre. L'apport de matière organique pourrait limiter la disponibilité du cuivre dans les parcelles. Si modifier le pH peut s'avérer intéressant à court terme car il limite la disponibilité immédiate du cuivre dans la

solution du sol, son effet à long terme pour les cultures est moins évident. En effet, c'est un des facteurs que la rhizosphère est le plus à même de modifier localement. Des mesures *in situ* devront être faites pour confirmer ces hypothèses.

Chapitre 3 : Effets d'une contamination cuprique modérée sur la vigne

Nous avons vu dans le chapitre précédent que les teneurs en cuivre total et en cuivre disponible varient considérablement d'une parcelle viticole à l'autre au sein d'une même appellation viticole. Or nous avons vu que le cuivre disponible peut devenir phytotoxique au-delà d'un certain seuil qui varie en fonction des espèces végétales (voir chapitre 1). Cela dépend d'une part de la capacité de la plante à absorber le cuivre disponible (on parle alors de cuivre biodisponible), puis à le stocker dans ses organes jusqu'à atteindre un seuil de toxicité aiguë ou chronique, pouvant ainsi provoquer des effets délétères sur le métabolisme de la plante.

Pour la vigne, peu d'études ont analysé la phytotoxicité du cuivre et celles qui ont été réalisées ont utilisé des gammes de concentrations très élevées (au-delà de 10 μM en Cu ou Cu^{2+}), plus importantes que celles trouvées en conditions environnementales. De plus, afin de comprendre par la suite d'éventuelles perturbations dans les relations plante hôte-bio agresseur, il est essentiel de caractériser la distribution du cuivre entre les différents organes. De plus, nous avons vu qu'une contamination cuprique modifiait l'absorption des éléments majeurs (N, Ca, K...) et traces (Fe), et donc le métabolisme primaire de la plante pouvant influencer sur l'appétence ou l'attractivité des arthropodes consommateurs, ou sur les capacités d'installation ou de croissance des pathogènes foliaires.

Nous présentons dans ce chapitre, les expérimentations menées dans le but de déterminer les effets d'une contamination cuprique modérée sur la vigne sur :

- la croissance et la morphologie des racines et des feuilles,
- la répartition du cuivre entre les organes,
- la composition chimique en fer et zinc, deux autres oligoéléments dont l'absorption ou la distribution pourrait être modifiée par un excès de cuivre,
- la composition chimique de la sève.

Ces différents paramètres peuvent en effet influencer sur les relations avec les bio-agresseurs qui choisissent leur hôte suivant des critères morphologiques, gustatifs ou chimiques.

Ainsi, nous souhaitons tester si une accumulation en cuivre dans le sol conduit à son accumulation dans les parties aériennes de la vigne (figure 56) et à partir de quels seuils apparaissent des effets délétères ou des modifications métaboliques.

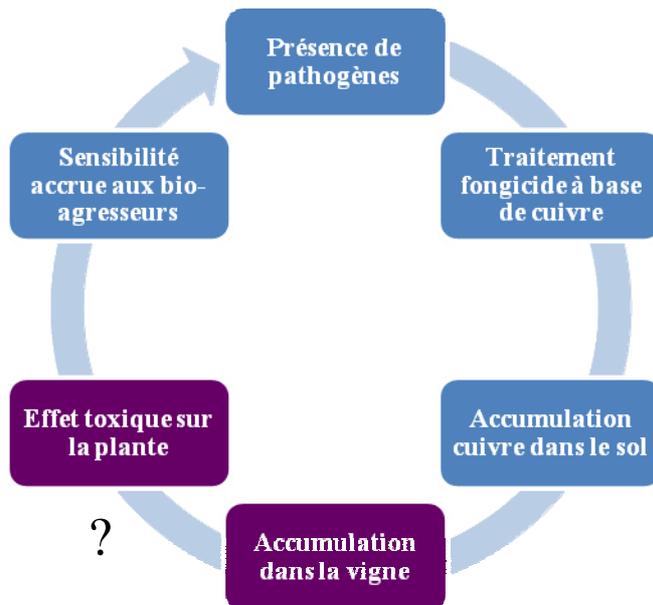


Figure 56: Question traitée dans ce chapitre par rapport au cadre général de la thèse

Pour cela, nous avons choisi une gamme de concentrations de 0,2 à 10 μM correspondant aux niveaux de concentration mesurés dans les solutions extraites des sols de la zone étudiée (0,1 à 7,5 μM).

Deux cépages de *V. vinifera* (Merlot, Cabernet Sauvignon) et un cépage d'espèce hybride *V. rupestris x V. riparia* (101.14) couramment utilisé comme porte-greffe en appellation Pessac-Léognan, ont été utilisés afin de tester s'il existait une variabilité de l'absorption et de la translocation du cuivre en fonction des cépages ou entre des espèces utilisées comme porte-greffe ou comme greffon.

Nous avons déterminé dans une première partie de ce chapitre l'évolution de la distribution du cuivre dans les différents organes de la vigne (racines, tiges, jeunes et vieilles feuilles) en fonction de l'exposition au cuivre des boutures. Nous avons également vérifié si cette exposition cuprique avait entraîné des différences de croissance racinaire et foliaires des boutures.

L'impact de la contamination cuprique sur la distribution du fer a également été mesuré pour ces trois cépages puisque l'excès de cuivre perturbe généralement l'absorption et la translocation du fer.

Dans une seconde partie, les conséquences d'une contamination cuprique sur le métabolisme de la vigne sont évaluées au travers de l'évolution de la composition de la sève élaborée de jeunes feuilles de Cabernet Sauvignon en fonction de l'exposition au cuivre des boutures.

3.1 Distribution du cuivre et du fer dans la vigne selon les cépages et en fonction du niveau de contamination cuprique du substrat

Cette partie est constituée d'un article soumis à Plant and Soil.

L'article est présenté pages suivantes, nous ne présentons ici qu'un résumé détaillé.

Résumé de cette publication et principales conclusions

L'objectif de notre étude est de mesurer l'effet d'une exposition croissante au cuivre sur sa distribution, et la composition chimique en fer et zinc dans les différents organes (racines R, tiges SB, jeunes feuilles F1 et vieilles feuilles FZ) de trois cultivars de vigne. Des boutures franches de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon et cv. Merlot et des boutures de *V. riparia* x *V. rupestris* cv. 101,14 ont été exposées pendant deux semaines à quatre concentrations de cuivre à 0,2-1-2,5 et 10 μM de cuivre total, après une période de six semaines de culture à une exposition contrôle (0,2 μM). Les cultures ont été réalisées sous serre. Le substrat de culture, a été préalablement contaminé au cuivre, puis les boutures ont été irriguées avec une solution nutritive enrichie en sulfate de cuivre. Le protocole de culture est identique à celui présenté dans la seconde partie. Un calcul de spéciation, en utilisant le code de calcul géochimique VMInteQ a montré que la majorité du cuivre était sous forme libre (Cu^{2+}).

La croissance foliaire a été suivie pendant la période de deux semaines d'exposition tandis que la longueur et l'épaisseur des racines ont été mesurées à la fin de l'exposition. Les concentrations de Fe, Zn et Cu dans les racines, les tiges, et deux étages foliaires de feuilles ont été mesurées après minéralisation à l'aide d'un spectromètre d'absorption atomique.

Les concentrations en cuivre dans les différents organes varient en fonction des cépages. Mais, de manière générale, les concentrations dans tous les organes augmentent brutalement dès que l'exposition cuprique atteint 10 μM .

Pour une même exposition au cuivre, les concentrations en cuivre dans les racines de Merlot sont plus faibles que celles mesurées dans les racines de Cabernet Sauvignon et du porte-greffe 101.14 alors que les concentrations de cuivre dans les parties aériennes de Merlot sont plus élevées que pour les deux autres cultivars.

Nous montrons ainsi que la translocation entre racines et parties aériennes dépend du cépage. Aucun effet négatif n'a été mesuré sur les racines, contrairement à ce qui est couramment observé en cas de phytotoxicité au cuivre. Ce résultat semble étonnant mais les expositions que nous avons testées sont faibles par rapport à celles testées dans la littérature.

Une diminution significative de la croissance des jeunes feuilles F1 est mesurée pour le Cabernet Sauvignon tandis que la croissance des feuilles a augmenté pour le Merlot et le 101.14.

Pour les 4 niveaux d'exposition au cuivre testés, contrairement à ce qui était attendu compte tenu des résultats de la littérature, il n'y a pas eu de différence significative de distribution du fer dans la vigne, excepté une augmentation de la teneur en fer des feuilles de 101.14 pour l'exposition à 10 μM de cuivre. La sensibilité à une carence en fer induite par un excès de cuivre, varie donc également en fonction des cultivars.

La concentration du cuivre dans la vigne dépend non seulement de la contamination de cuivre dans le sol, mais aussi du génotype du cultivar et de sa stratégie de lutte contre l'excès de cuivre, notamment au travers de la translocation ou non vers les parties aériennes. Une expérience pourrait être menée sur des plants greffés de vigne afin de déterminer si le greffage induit des modifications dans la distribution du cuivre.

Article soumis en pre-review à *Plant and Soil* le 12 novembre 2014

Soil copper accumulation and distribution in grapevine depends on the cultivar

Anatole-Monnier Laetitia 1234

Denaix Laurence 23*

Thiéry Denis 13

1 INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon, France

2 INRA, UMR1391 Interactions Sol-Plantes –Atmosphere (ISPA), F-33140 Villenave d'Ornon, France

3 Bordeaux Sciences Agro, Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, F-33140 Villenave d'Ornon, France

4 AgroParisTech, F-75005 Paris, France

* corresponding author

Abstract

The aim of this study was to monitor the effect of increasing copper exposure on the copper and iron distribution in different organs of three grapevine varieties. Cuttings of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon and cv. Merlot and cuttings of rootstock *V. riparia* x *V. rupestris* cv. 101.14 were exposed to four concentrations of copper (0.2-1-2.5-10 μM Cu) in a greenhouse for two weeks. Leaf growth was monitored during the two-week period of exposure. The concentrations of Cu and Fe in the roots, stems and several stages of leaf development were measured using an atomic absorption spectrometer.

Whatever the cultivar, the concentration of copper increased in the roots (11 to 663 mg Cu/kg dry weight) with an increase in Cu exposure, and remained equal to 5 mg Cu/kg DM in the aerial parts until the exposure reached 10 μM . The concentrations of copper in stems and young leaves increased to 11 mg Cu/kg DW at an exposure of 10 μM Cu. The roots of Merlot accumulated less copper than the roots of Cabernet Sauvignon and 101.14 whereas copper concentrations in the aerial parts of Merlot were higher than in both the other varieties. The translocation of Cu to the aerial parts varied with the cultivar. A significant decrease in the growth of young leaves was observed in Cabernet Sauvignon whereas leaf growth increased in Merlot and 101.14 at 10 μM exposure. Cu excess disturbed Fe distribution in grapevine only in 101.14 at 10 μM Cu. Sensitivity to a Fe deficiency caused by exposure to Cu was cultivar dependent.

The concentration of copper in plants depends not only on copper contamination in soil, but also on the plant genotype and its strategy against copper excess. Our main result is that differences in plant genotypes are a key factor. A genetic approach could thus be useful to select suitable varieties with the better tolerance to copper stress.

Highlights

We studied Cu distribution in three grapevine cultivars at 4 levels of Cu exposure

The regulation of the Cu absorption and its translocation is cultivar dependent

Sensitivity to Fe deficiency caused by Cu and Fe translocation is cultivar dependent

Young leaves are the first aerial organ to be affected by excess Cu

Cultivars with higher tolerance to copper should be selected

Keywords

Copper translocation; Copper absorption; Iron; Grapevine, Cultivars

Introduction

Since the middle of the 19th century, Bordeaux mixture, which is based on copper sulfate, has been widely used to protect grapevine against downy mildew (*Plasmopara viticola*), one of the most serious pathogens of vine (Gessler et al., 2011). At the beginning of the 20th century, doses of 20-50 kg Cu per hectare were applied several times a year whereas only 6 kg Cu per hectare and per year are applied today. The intensive repeated use of copper sulfate over a period of many years led to diffuse contamination of soils, which can reach concentrations as high as 1,030 mg kg⁻¹ in several French agrosystems (Michaud et al., 2007) and even 3,200 mg kg⁻¹ in Brazil (Mirlean et al., 2007).

Copper is an essential plant nutrient and is involved in many functions. It is a structural element of proteins, photosynthetic electron transport. It affects mitochondrial respiration, oxidative stress response, and cell wall metabolism. It is a cofactor in many enzymes and plays a role in cellular iron mobilization (Yruela 2005). However at high doses, it becomes phytotoxic, causing oxidant stress, which in turn, results in, metabolic and morphological modifications of the cell (Yruela, 2005). The main visible symptoms are chlorosis (Michaud et al., 2007), a reduction in root length (Juang et al., 2012, Koppitke and Menzies, 2006), root thickening (Panou-Filothéou and Bosabalidis, 2004, Marschner, 1995) and a reduction in root biomass (Bravin, 2008), dwarfism and death being observed in the most severe cases.

Plants have several mechanisms they can use to tolerate high concentrations of copper. They can limit copper bioavailability in the soil and copper absorption by modifying soil pH, by interacting with mycorrhizae or producing extracellular exudates containing organic ligands (Hall, 2002). They can use an exclusion strategy, a sequestration strategy, or both to limit toxic effects. The exclusion strategy is based on the storage of copper in roots, particularly in cell walls, to limit copper transfer to the aerial parts (Hall, 2002). The sequestration strategy consists of compartmentalizing copper in vacuoles after binding it with different organic compounds including phytochelatins, metallothioneins, heat shock proteins, and amino acids. This also increases plant copper tolerance (Clemens, 2001, Hall, 2002). One important plant mechanism is compartmentalization between organs: most plants store metals in their roots (Angelova et al., 1999), while only a few plants accumulate more metals in shoots, e.g. *H. radicata* (Brun et al., 1998) or *H. incana* (Poschenrieder et al., 2001). Studying the distribution of copper between organs is thus a good way to identify the strategy used by the plant.

The degree of copper toxicity, corresponding to EC50 on root growth, varies with the species: 2.2 µM Cu for cowpea (Koppitke and Menzies, 2006), 7.7 µM Cu for durum wheat (Michaud et al., 2008) and more than 15.7 µM Cu for common reed (Ali et al., 2002). Fifty percent reduction in root elongation was demonstrated at 3.9 µM Cu (Juang et al., 2012) in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Kyoho).

Wild grape *Vitis vinifera* sp. Sylvestris appears to be more tolerant to copper than commercial cultivars (Cambrolle et al., 2013). Under high copper contamination, the root:shoot ratio appears to depend on the variety or species of grapevine (Romeu-Moreno and Mas, 1999). But changes in this ratio, for copper values below toxic levels, are not well described. Such information should help choose grape varieties that are adapted to the level of copper

contamination of the soil concerned. In addition, the distribution of copper between young and old leaves is poorly studied and may differ with the variety or species of grapevine.

The focus of this study was thus on the accumulation and distribution of copper in grapevine with three specific objectives: (1) To compare the accumulation of copper between two widely used species of grapevine: *Vitis vinifera*, used as the graft, and *Vitis riparia x rupestris*, used as the rootstock, and between two cultivars of *Vitis vinifera* widely used throughout the world (Merlot and Cabernet Sauvignon) subjected to moderate doses of copper; (2) To describe the distribution of copper between plant organs with an increase in exposure to copper; (3) to investigate the distribution of Fe and Zn in these plants as the distribution of other cations in plants may be affected by excess copper. A hydroponic study was conducted in the greenhouse with grapevine cuttings using moderate concentrations of copper in solution, i.e. from 0.2 to 10 μM , which corresponds to the exposure levels observed in the environment. Copper, iron, and zinc concentrations were analyzed separately in the leaves, stem, and roots.

Materials and methods

Grapevine and growth conditions

Grape cuttings of two *Vitis vinifera* cultivars (Merlot and Cabernet Sauvignon) and one cultivar of *Vitis riparia x Vitis rupestris* (101.14) were grown from canes collected in vineyards the preceding year and stored in plastic bags at 4 °C in the dark. The cuttings were planted in individual pots of perlite in a greenhouse at 20 °C. Cuttings were sprayed with water for the first four weeks, and then drip irrigated for two weeks with a nutrient solution containing NH_4NO_3 0.3 g L⁻¹, KNO_3 0.1290 g L⁻¹, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.15 g L⁻¹, MgSO_4 0.25 g L⁻¹, CaCl_2 0.0555 g L⁻¹, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.118 g L⁻¹, H_3BO_3 0.0286 g L⁻¹, MnCl_2 0.3958 mg L⁻¹, ZnSO_4 2.2 mg L⁻¹, H_2MoO_4 0.2 mg L⁻¹, FeNaEDTA 7.3410 mg L⁻¹.

After six weeks, the cuttings were transplanted in perlite pots (30 replicates per treatment and per cultivar). The perlite had previously been contaminated with a copper sulfate solution (Merck 99% pure $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) at four concentrations: 0.2 (control), 1, 2.5, and 10 μM Cu.

During the two-week period of exposure, the pots were irrigated with nutrient solution without FeNaEDTA to avoid copper complexation. The copper sulfate solution was added directly to the pots by drip to maintain the original level of copper exposure i.e., 0.2, 1, 2.5, and 10 μM .

Chemical analysis

The length and width of the young leaves were measured daily during the two-week period of copper exposure. We selected a single leaf position (L1) on each of the 30 plants for each copper concentration tested. We measured the length of this leaf every day and the length gain was the increase between two days, expressed in cm.

After two weeks of exposure, the plants were harvested and plant parts were separated using a ceramic knife. Starting from the apical bud, we distinguished the first young leaf with a diameter of more than 3 cm (L0), the second young leaf (L1), while all the mature leaves were pooled and named LZ. L0 and L1 appeared during the period of copper exposure and LZ were present as mature leaves before the exposure to copper began. We also collected the stem (SB) and the roots R. The plant organs were cleaned three times with deionized water and weighed before and after freeze-drying for more than 48 h. To obtain sufficient material

for analysis, the parts of five vine cuttings exposed to the same quantity of copper were pooled. Six replicates per organ were analyzed for each level of copper exposure. All the dried roots were milled before digestion (Oscillating vibro-mill Retsch® MM400). The leaves and stems were digested after manual cutting. The dried samples were digested in a mixture of concentrated HNO₃ (2.5 mL) and pure H₂O₂ (3 mL) with the Digiprep® (MS SCP Science). The samples were diluted with ultra pure water (Ultrapure type1 water, Synergy® UV) to obtain 50 mL of solution.

Concentrations of Cu, Zn and Fe were measured with an atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer PinAAcle 900T). The accuracy of the measurement procedure was checked using blanks and standard reference material (NIST 1547 peach leaves) during digestion and analyses. Deviation from the standard value was less than 10%.

Data and statistical analyses

All statistical analyses were performed with R.3.0.1. The level of significance was set at $p \leq 0.05$ (two tailed).

Normality and homogeneity of variances were checked using the Shapiro test and the Levene test. Data on biomass, on the distribution of copper, zinc and iron in the aerial parts of the cuttings were processed using analysis of variance (ANOVA) after which Tukey's HSD post-hoc test was used to compare means. Data on the distribution of copper, zinc and iron in the roots did not follow a normal distribution, so the non-parametric Kruskal-Wallis and Wilcoxon post-hoc test were used to compare means.

Results

Effect of copper on growth

At any one concentration, root or shoot biomass differed depending on the cultivar. The 101.14 rootstock produced the lowest biomass whatever the organ, and Merlot the highest ($p < 0.01$).

For each cultivar, the increase in copper exposure had no significant effect on leaf or stem mass (table 12). Root biomass did not significantly differ between cultivars except for Merlot roots at a concentration of 10 μM ($p = 0.048$).

Tableau 12: Biomass and length of grapevine organs as a function of different copper exposures. Values (mean \pm se dry matter) followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.05$)

Cabernet Sauvignon							
Cu μM	Young leaf L1 Weight (mg)	Stem Weight (mg)	SB Weight (mg)	Roots R Weight (mg)	L1 Length gain (cm)	R Length $\varnothing \leq 1.5(\text{cm})$	R Length $\varnothing > 1.5(\text{cm})$
0.2	103.4 \pm 7.4a	189.6 \pm 22.8a	208.4 \pm 39.6a	1.0 \pm 0.2ab	794.0 \pm 58.4a	73.6 \pm 1.9a	
1	92.2 \pm 8.2a	212.6 \pm 22.2a	231.2 \pm 35.8a	1.3 \pm 0.1a	857.8 \pm 50.0a	85.4 \pm 7.9a	
2.5	96.8 \pm 5.2a	216.8 \pm 21.0a	239.6 \pm 33.6a	1.0 \pm 0.2ab	1062.4 \pm 77.3a	90.8 \pm 9.9a	
10	103.8 \pm 2.8a	170.8 \pm 25.8a	243.6 \pm 33.4a	0.6 \pm 0.2b	816.2 \pm 93.3a	81.2 \pm 9.2a	
Merlot							
0.2	127.8 \pm 9.2a'	261.4 \pm 32.6a'	403.8 \pm 46.4a'	1.1 \pm 0.2a'	885.4 \pm 76.9a'	122.0 \pm 12.4a'	
1	120.2 \pm 9.0a'	354.0 \pm 29.4a'	457.6 \pm 29.0a'	1.5 \pm 0.1a'	1023.4 \pm 89.7a'	133.0 \pm 10.6a'	
2.5	87.8 \pm 6.8a'	343.2 \pm 37.6a'	439.6 \pm 29.6a'	2.2 \pm 0.2b'	806.0 \pm 70.4a'	124.4 \pm 13.3a'	
10	94.2 \pm 12.2a'	313.8 \pm 23.8a'	523.4 \pm 35.8b'	2.3 \pm 0.2b'	1041.4 \pm 96.3a'	164.5 \pm 14.6a'	
101.14							
0.2	62.0 \pm 0.5a''	126.2 \pm 40.7a''	57.0 \pm 8.5a''	1.3 \pm 0.2a''	653.9 \pm 63.6a''	5.4 \pm 0.8a''	
1	60.5 \pm 0.7a''	143.7 \pm 10.2a''	79.7 \pm 2.7a''	1.2 \pm 0.3a''	889.8 \pm 152.0a''	4.2 \pm 0.9a''	

2.5	28.0± 0.2a''	173.7±7.7a''	102.7± 9.7a''	1.3±0.2a''	640.5±89.6a''	7.6±1.5a''
10	68.0± 1.2a''	149.7±12.0a''	109.2± 11.7a''	1.4±0.4a''	759.8±64.9a''	6.3±1.7a''

The length gain of the L1 leaf tended to decrease (but not significantly) ($p=0.06$) with an increase in the level of exposure in Cabernet Sauvignon, but increased in Merlot ($p<10^{-4}$) and remained the same in 101.14 with an increase in copper exposure. No effect of copper on root diameter or root length was observed.

The main difference between cultivars was in the length of the large roots. Indeed, the length proportion of large roots (diameter > 1.5 mm) to total length varied from 0.5% in 101.14 to 14% in Merlot (table 12).

Even when we analyzed the length of the root as a function of its diameter (larger or smaller than 1.5 mm), no effect was observed with an increase in exposure.

Copper distribution in vine according to the cultivar at control exposure

We checked that the concentration of copper in the canes before the sprouting did not significantly differ between cultivars and was equal to 15.5 mg Cu.kg⁻¹ DW.

Cu concentrations were measured in all organs. Since L0 behaved like L1, we present only the results for L1, LZ, SB and roots.

At 0.2µM Cu exposure, which corresponds to the optimal micronutrient level for vine, the concentration of copper in the roots was significantly higher than in the leaves or stems whatever the cultivar (Figure 1). However, the concentration of copper in the roots differed significantly among the cultivars. It was lowest in Merlot (11.2±0.1 mg Cu.kg⁻¹), intermediate in Cabernet Sauvignon (16.2±0.3 mg Cu.kg⁻¹) and highest in 101.14 (18.7±0.3 mg Cu.kg⁻¹).

Differences were found between shoots (leaves and stems) depending on the cultivar. In the shoots, the concentration of copper in Cabernet Sauvignon shoots (e.g. 3.6±0.3 mg Cu.kg⁻¹ for L1) was lower than in the other cultivars (Merlot 4.8±0.2 mg Cu.kg⁻¹ and 101.14 5.6±0.9 mg Cu.kg⁻¹) ($p<0.05$) at 0.2 µM copper exposure.

In Cabernet Sauvignon, the concentration of copper in old leaves LZ was higher than in young leaves L1, ($p<0.05$), whereas in the stem SB, the concentration was between the two (Figure 1). There was no significant difference between the shoots of 101.14 and of Merlot.

At the control exposure, Cabernet Sauvignon had the lowest concentration in young leaves and Merlot had the highest. 101.14 had the highest concentration in the roots and Merlot the lowest.

Copper distribution in grapevine organs

The concentration of copper in the roots increased with an increase in copper exposure whereas the concentrations of copper in the shoots remained stable except at 10µM Cu exposure (figure 57).

□ Cu 0.2 μM ■ Cu 1 μM ■ Cu 2.5 μM ■ Cu 10 μM

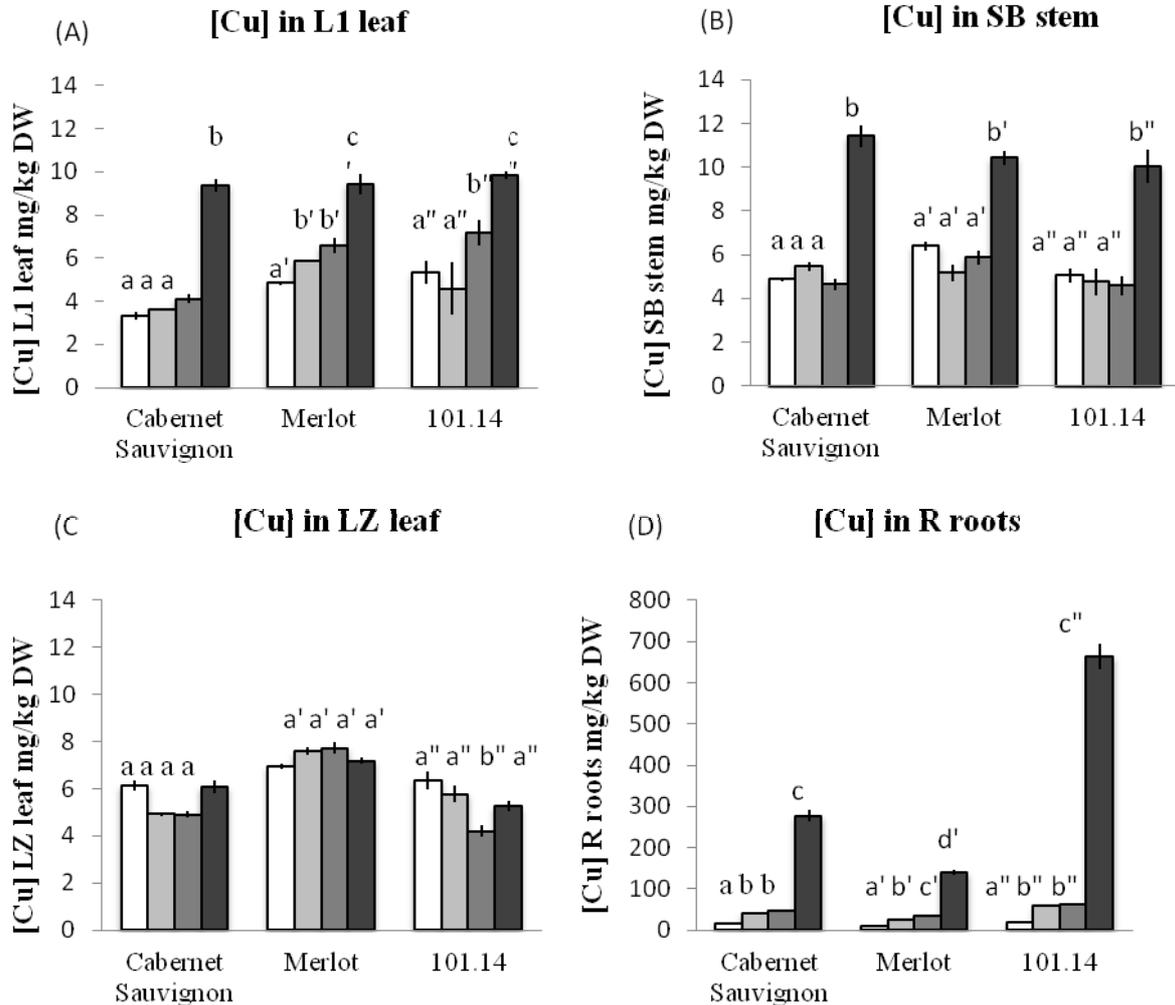


Figure 57: Concentrations of copper (mean ± se) in four organs: young leaf L1 (A), stem SB (B), old leaf LZ (C), and roots R (D) of grapevine cuttings as a function of an increase in copper exposure. In each graph, values with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

In young leaves L1, at an exposure lower than or equal to 1 μM, copper concentrations in Cabernet Sauvignon and in 101.14 were initially stable and then increased, whereas in Merlot, the concentration of copper in the L1 leaf increased progressively with an increase in exposure (figure 57A). At 10 μM Cu exposure, the concentration of copper in the L1 leaf did not significantly differ between cultivars ($P < 10^{-6}$).

In contrast to growing leaves, the concentration of copper in old leaves LZ was stable and remained the same as the initial concentration even with an increase in copper exposure, except in 101.14 at a concentration of 2.5 μM Cu (figure 57C). Old Merlot leaves had a higher copper concentration than those of Cabernet Sauvignon and 101.14 ($p < 10^{-4}$).

When copper exposure was lower than or equal to 2.5 μM, copper concentrations in the stem SB remained constant whatever the cultivar (figure 57B), but at 10 μM exposure, these concentrations increased abruptly ($p < 10^{-7}$). In contrast to leaves, there was no significant difference in the stems of Cabernet Sauvignon, Merlot and 101.14.

The concentration of copper in the roots increased with an increase in exposure (figure 57D). The concentration of copper in the roots was lowest in Merlot and highest in 101.14 whatever the copper exposure tested ($p < 0.05$).

Effect of copper exposure on iron and zinc distribution

At the control concentration, there was no significant difference in the iron concentration in the shoots before and after iron weaning except in L0 Cabernet Sauvignon ($p < 0.001$). Whatever the concentration exposure, no symptoms of chlorosis were observed in Merlot or 101.14 leaves but chlorotic spots with a typical yellow green color were observed in 8% of the Cabernet Sauvignon leaves on exposure to 10 μM Cu.

At 0.2 μM , iron and zinc concentrations were higher in roots than in stems and leaves whatever the cultivar (table 2). Like copper, the iron and zinc concentrations in the roots were highest in 101.14 and lowest in Merlot.

In all three grape cultivars, iron concentrations were higher in the leaves than in the stem. There was no significant difference in the iron concentrations in all the leaves in Merlot and 101.14, whatever the state of maturity of the leaf whereas, in Cabernet Sauvignon, the concentration of iron increased with leaf maturity. Of the three cultivars, Merlot had the highest iron concentration in young leaves and 101.14 had the highest iron concentration in stems.

In contrast to iron, zinc concentrations were higher in stems than in leaves and zinc concentrations were twofold higher in mature leaves LZ than in young leaves in all three grape cultivars tested. There were no differences in the concentrations of zinc in stems and old leaves but concentrations were highest in the young leaves L1 of Cabernet Sauvignon (table 13).

Tableau 13: Fe and Zn concentrations in young leaves (L1), old leaves (LZ), stems (SB) and roots (R) of Cabernet Sauvignon, Merlot and 101.14 at Cu 0.2 μM exposure, which corresponds to the optimal level of copper as a micronutrient for vine. Values (mean \pm se dry weight) followed by the same letter in the same line and for each metal are not significantly different ($p > 0.05$).

	Fe (mg.kg ⁻¹ DW)			Zn (mg.kg ⁻¹ DW)		
	Cabernet Sauvignon	Merlot	101.14	Cabernet Sauvignon	Merlot	101.14
Leaf L1	53.4 \pm 3.5a	84.9 \pm 3.0b	56.6 \pm 6.4a	17.9 \pm 0.1a'	16.6 \pm 0.8b'	15.1 \pm 0.9b'
Leaf LZ	99.6 \pm 4.8a	87.7 \pm 1.9b	57.3 \pm 5.6c	30.7 \pm 1.4a'	31.4 \pm 0.7a'	31.9 \pm 3.0a'
Stem SB	26.1 \pm 1.7a	27.6 \pm 3.7a	42.1 \pm 4.6b	60.0 \pm 3.8a'	64.4 \pm 5.6a'	53.6 \pm 4.3a'
Roots R	290.5 \pm 20.0a	171.3 \pm 2.5b	349.2 \pm 60.0c	194.8 \pm 10.2a'	74.2 \pm 14.7b'	356.6 \pm 9.2c'

No modification of zinc distribution was observed with an increase in copper exposure whatever the cultivar (data not shown), but there was a change in iron distribution (figure 58). Iron concentration remained higher in roots than in the shoots in all cultivars, whatever the level of Cu exposure (Figure 58).

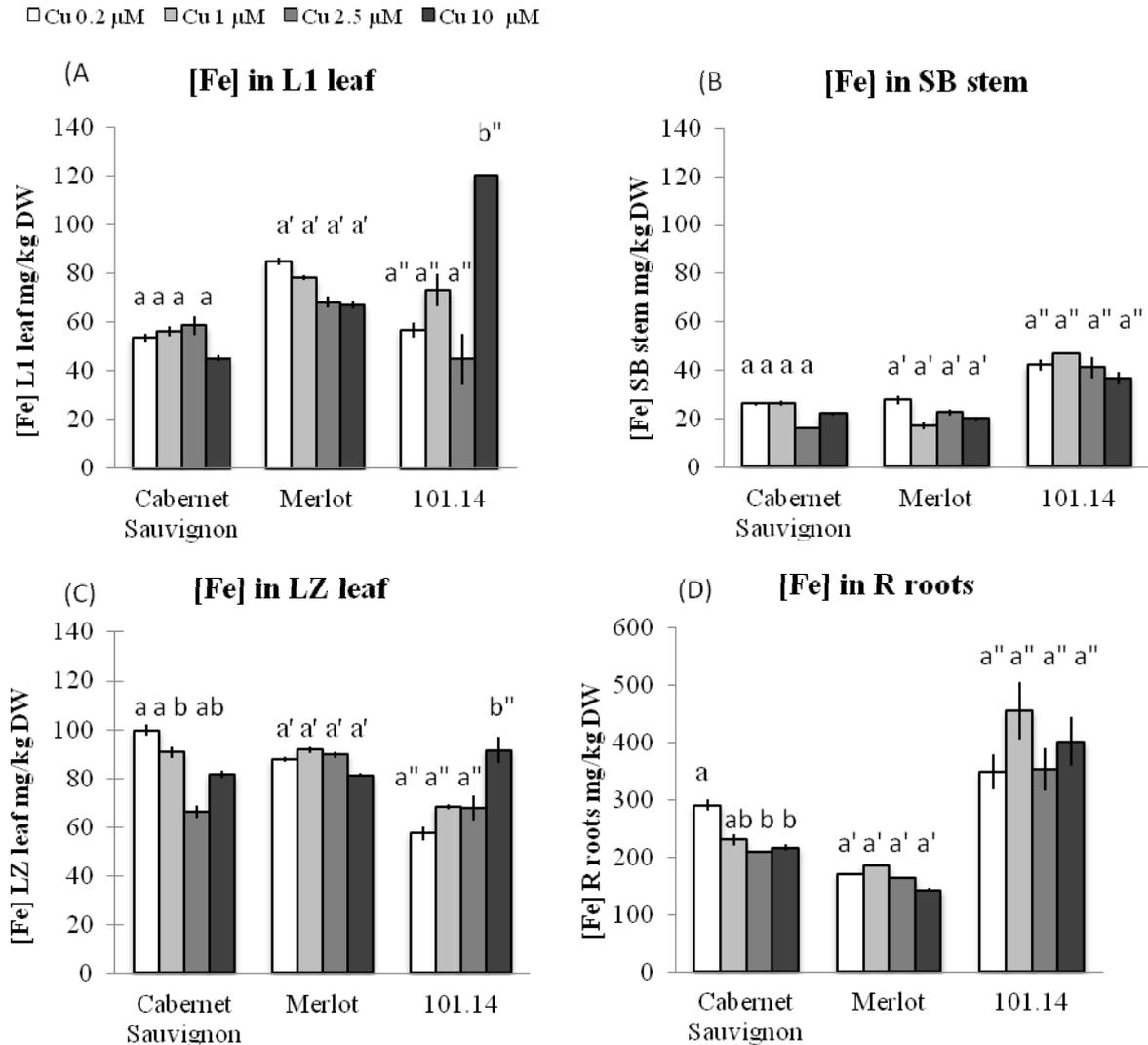


Figure 58: Iron concentrations (mean \pm se) in four organs: young leaves L1 (A), stem SB (B), old leaves LZ (C) and roots R (D) with an increase in exposure to copper. In each graph, values with the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

The concentration of iron in the stems SB remained stable and was always lower than in leaves whatever the cultivar and whatever the level of copper exposure ($p < 10^{-6}$). 101.14 had the highest iron concentration in stems (figure 58B).

Whereas in 101.14, the concentration of iron in leaves increased sharply at 10 μ M Cu exposure ($p = 0.007$), it remained stable in the leaves of Merlot and Cabernet Sauvignon (figure 58A, 58C), except in LZ in Cabernet Sauvignon at 2.5 μ M Cu. In Cabernet Sauvignon, the concentration of iron in young leaves L1 was lower than in old leaves LZ.

There was no significant difference in the concentration of iron in the roots of Merlot or 101.14 whatever the copper exposure whereas in Cabernet Sauvignon, the highest iron concentration was measured at 0.2 μ M Cu exposure ($p = 0.012$) (figure 58D). Whatever the level of copper exposure, the concentration of iron in the roots was lowest in Merlot and highest in 101.14. ($p < 10^{-7}$).

Copper bioconcentration factors (BCF) and translocation factors (TF)

The bioconcentration factor (BCF) was defined as the ratio of copper concentration in roots to the concentration of copper in the hydroponic solution. Whatever the exposure, the BCF was always highest in 101.14 and lowest in Merlot. At 0.2 μM Cu, the BCF was 1.5 fold higher in 101.14 than in Merlot.

When exposure to copper increased from 0.2 to 10 μM , the BCF decreased progressively in Merlot and Cabernet Sauvignon (Figure 59). In 101.14 rootstock, BCF decreased until 2.5 μM Cu exposure, but increased at 10 μM Cu. When the exposure to copper increased, all three grapevine cultivars regulated absorption of copper or its storage in their roots but the regulation appeared to be most efficient in Merlot.

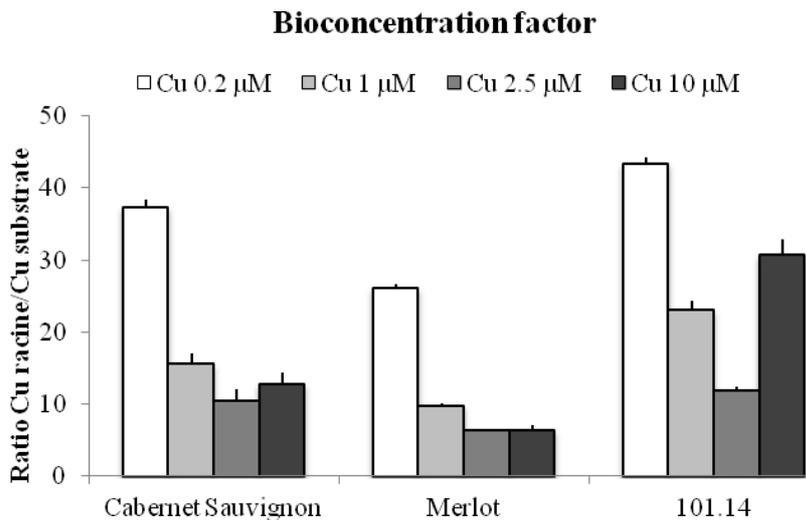


Figure 59: Bioconcentration factors in Cabernet Sauvignon, Merlot and 101.14 as a function of the level of copper exposure.

The translocation factor (TF) was calculated as the ratio of copper concentration in the young leaves L0 to copper concentration in the roots. It reveals the translocation of copper from the roots to the leaves.

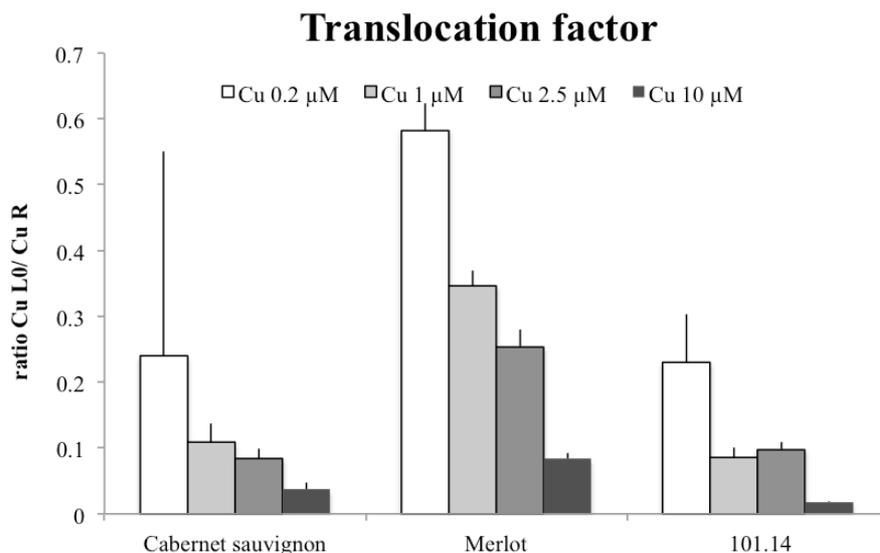


Figure 60: Translocation factor for Cabernet Sauvignon, Merlot and 101.14 as a function of Cu exposure.

The copper translocation factor decreased gradually with an increase in exposure to copper (figure 60). It was divided by 6 in Cabernet Sauvignon and Merlot and by 16 in 101.14 when exposure increased from 0.2 μM to 10 μM . In Merlot, the ratio was 2 to 3-fold higher than the others whatever the level of exposure.

Discussion

This study focused on differences on copper accumulation and distribution between three grape cultivars (*Vitis riparia x rupestris* 101.14 and *Vitis vinifera* cv. Merlot and cv. Cabernet Sauvignon) subjected to moderate doses of copper, on changes in the distribution of copper with an increase in copper exposure and then on the effects of copper exposure on the distribution of iron and zinc in the plants.

Copper phytotoxicity depends on the cultivar

Several studies have already shown that the first effect of copper phytotoxicity is rhizotoxicity (Chopin et al., 2008, Ko et al., 2007, Juang et al., 2012). At higher levels of copper exposure, copper phytotoxicity affects shoots differently than roots.

We did not observe any morphological effects on root length, diameter or biomass in *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, cv. Merlot or in *V. rupestris x V. berlandieri* cv. 101.14 after 15 days of exposure. However, our results revealed an effect on leaf growth at 10 μM Cu.

The results we obtained in Merlot and 101.14 are opposite to those observed in other cultivars. In other studies, both a decrease in leaf growth and in root length was observed after 15 days of exposure to 10 μM Cu in *V. vinifera* cv. Kyoho (Juang et al., 2012), after two months of exposure to 5 $\mu\text{g Cu.g}^{-1}$ in *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, cv. Sauvignon and R110 (*V. rupestris x V. berlandieri* (Romeu-Moreno and Mas, 1999) and after one month of exposure to 23 mM in *V. vinifera* sp. *Sylvestris* (Cambrolle et al., 2013). Taken together, these results and ours suggest that the tolerance to copper could be species or cultivar dependent.

The difference between our results and those of Romeu-Moreno and Mas (1999) in Cabernet Sauvignon, could be due to the longer exposure period than the 15 day period we used in our study. Fifteen days exposure would be too short to affect biomass production. Our experimental conditions may also have influenced plant responses. A different pH or different chemical composition of the hydroponic solution could affect either the availability of copper or competition between copper and major cations for surface sorption sites in the apoplast.

Differences in Cu concentration and root absorption and in Cu translocation in the three cultivars at Cu control exposure

Many studies have already shown that the copper concentration in grape roots is higher than in the shoots (Romeu-Moreno and Mas, 1999, Chopin et al., 2008, Juang et al., 2012, Miotto et al., 2014). At control exposure, we observed different concentrations of copper in the roots between cultivars, while no difference between cultivars was found by Romeu-Moreno and Mas (1999). In our study, the highest copper concentrations in the roots were measured in cultivars that produced the fewest large roots.

However, our results also showed that, at the control exposure, the concentration of copper in shoots varied with the cultivar. We thus conclude that translocation of copper to the aerial parts varies with the cultivar, with greater translocation in Merlot than in 101.14 and above in Cabernet Sauvignon.

The regulation of copper absorption and its translocation vary with the cultivar

Our results showed that when the concentration of copper in the nutrient solution was increased, the increase in the concentration of copper in the roots varied with the cultivar. When the level of exposure increased, Merlot stored more copper than 101.14 and Cabernet Sauvignon.

In Merlot shoots, we observed a gradual increase in the concentration of copper. In the leaves of Cabernet Sauvignon and 101.14, the concentration remained constant up to 2.5 μM , as the plant regulated the translocation but at 10 μM , it increased abruptly, as if the regulation mechanisms had been disturbed.

Furthermore, when the copper exposure increased up to 2.5 μM Cu, the BCF decreased while the leaf and root biomass did not differ from the control and the copper concentration in the aerial parts remained stable. Therefore, when exposed to copper, grapevine appears to regulate copper absorption and storage in roots as already observed in cv. Kyoho (Juang et al., 2012). As the variation in BCF differed with the cultivar, the regulation of copper absorption and storage also appears to be cultivar dependent.

This hypothesis was reinforced particularly at the highest exposure (10 μM Cu) as the BCF increased in 101.14 but not in the two other cultivars. We thus conclude that the system of regulation of copper absorption in roots is less effective in 101.14 at this level of exposure, resulting in the marked increase in the amount of copper stored in roots.

When the level of exposure to copper increased, the copper transfer factor decreased gradually in Merlot while it remained stable in Cabernet Sauvignon and in 101.14 from 1 to 2.5 μM Cu exposure. However, our results showed that at 10 μM , the copper transfer factor decreased while copper concentration increased both in the young leaves and in stems in all three cultivars. The same TF decrease, the same increase in copper concentration was also observed in stems at 10 μM Cu but only above 25 μM Cu exposure in leaves of Kyoho (Juang et al., 2012).

A stable Cu concentration in leaves has already been reported in Sauvignon and R110 (Romeu-Moreno and Mas, 1999), and in Sangoviese (Toselli et al., 2008), and an increase in Cu concentration was measured in leaves of Cabernet Sauvignon and Chardonnay (Ko et al., 2007), whereas an increase of Cu concentration was observed only in leaves and not in stems in grafted Cabernet Sauvignon (Miotto et al., 2014). It is due to the dilution effect caused by the increase in biomass that an increase in the amount of copper was found in these stems (Miotto et al., 2014). Thus we can conclude that the level of copper contamination leading to a change in the translocation of copper to the aerial parts varies with the cultivar.

Our results show that at 10 μM Cu exposure, copper was translocated to young growing organs where the copper concentration increased whereas it remained stable in old leaves, which had reached maturity before exposure to Cu began. These results disagree with the results obtained by Ko et al. (2007) who found no difference in copper translocation between young leaves and old leaves in cv. Chardonnay and Cabernet Sauvignon, whereas both their leaves were exposed to the same concentration of copper during maturity. However, these authors cultivated the grapevine at the same level of exposure throughout their experiment whereas we modified the level of exposure during the course of the experiment. Our results suggest that there was no redistribution of copper to old leaves with an increase in the level of exposure in Merlot, Cabernet Sauvignon or 101.14. The concentration of copper measured in leaves indicates the level of copper contamination of plant at the stage of growth of the leaf. Differences between old and young leaves have rarely been investigated in grapevine. Our

results suggest that measuring the copper concentration in young leaves could be a good instantaneous marker of the risk of copper toxicity.

Independent copper and zinc dynamics

At Cu control exposure, unlike Romeu-Moreno and Mas (1999), we observed a difference in the concentration of zinc in the roots depending on the cultivar. Like for copper and iron, the concentration of zinc in the roots and in the shoot was higher in 101.14 than in Cabernet Sauvignon and Merlot. No difference was observed in the concentration of zinc in the shoot between the cultivars. These results suggest differences in copper and zinc absorption and storage mechanisms in the three cultivars.

However, when the Cu exposure increased, no differences were observed between the three cvs and the control in the concentration of zinc in roots or on its translocation, thereby confirming the results obtained in previous studies (Romeu-Moreno and Mas, 1999, Toselli et al., 2008, Angelova et al., 1999). There is thus no competition between these two cations, which follow independent pathways and use independent transporters (Grotz and Guérinot, 2006).

The Fe / Cu balance in grapevine depends on the cultivar

In our study, no iron was added during the period of exposure to avoid affecting copper speciation in the hydroponic solution. But our experimental setup led to iron weaning of the grapevine for a period of 15 days. This iron weaning had no effect on the iron concentration in the plant organs, except for a decrease in the iron concentration in the roots of Cabernet Sauvignon. Most iron in roots is located in the apoplasm. Under iron deficiency or weaning, plants absorb iron from the apoplasm (Kim and Guerinot, 2007). This root compartment may thus act as a buffer that discharges iron in the root symplasm as a function of the iron concentration in order to maintain homeostasis. This would explain why the iron concentrations in the roots decreased over the course of the experiment, as we measured the total iron sorbed on the apoplasm or absorbed in the symplasm.

Excess copper has been reported to disturb iron homeostasis and cause chlorosis (McBride, 2001, Michaud et al., 2008). The concentration of iron in wheat shoots decreased with an increase in the copper concentration in the nutrient solution, especially at low doses of iron (Michaud et al. 2008). In grapes, a similar phenomenon has been described in cv. Cabernet Sauvignon (Romeu-Moreno and Mas, 1999) and in cv. Sangovièse (Toselli et al., 2008) suggesting antagonism between copper and iron in plants. However, our results did not reveal such an effect in the Merlot and Cabernet Sauvignon cultivars but rather the inverse effect in the rootstock. This cannot be attributed to a dilution factor due to leaf growth since in Cabernet Sauvignon leaf growth decreased with an increase in copper.

Therefore, the decrease in the iron concentration is not the result of increased biomass. Rather, the reduction in growth is linked to iron deficiency before the appearance of chlorosis (Diaz et al., 2009, Ksouri et al., 2005). Sensitivity to iron deficiency is thus cultivar dependent.

Together, this suggests that Cu/Fe interactions may be more complicated than previously thought, probably depending on the part of the plant considered and on the grape cultivar or species studied. Such differences between different genotypes could be the results of the use of different metal transporters. Like *Arabidopsis thaliana*, grapevine probably has two iron transport mechanisms: IRT1, which can transport multiple divalent metals, and IRT2, which

transport Fe and Zn (Kim and Guerinot, 2007). We suggest that transporter IRT1, which is more sensitive to competition between Fe and Cu, could be favored in Cabernet Sauvignon and transporter IRT2, which is independent to copper, could be favored in Merlot.

Conclusion

Concentrations of copper in plants depend not only on copper contamination in the soil, but also on the plant genotype and its strategy to cope with excess copper, Our main result is that differences in plant genotypes is a key factor.

Copper absorption and copper transfer varied among the cultivars and species of *Vitis*. Copper absorption and storage in roots was higher in the rootstock of 101.14 (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) than in *Vitis vinifera* whereas Merlot (*V. vinifera*) displayed the highest copper translocation to aerial parts. Copper transfer to the aerial parts is controlled by each cultivar, but at 10 μM exposure, the concentration of copper increased in growing organs (leaves and stems). Consequently, the concentration of copper in the stems of old vineyards before uprooting, could be used to evaluate the risk of copper toxicity and hence the difficulties of growth for future young grapevines. Young grapevines are particularly sensitive to accumulation of copper in the soil.

As copper accumulates in soil and copper fungicides continue to be used, grafted plants (both scion and rootstock) of vine should also be selected according to their tolerance to copper. For the scion, both a better binding capacity of iron in leaves and a better copper stress tolerance in aerial parts could be selected. *V. Vinifera* sp. *Sylvestris* or Merlot would be good candidates in this respect. Rootstock, which was selected for resistance to Phylloxera, drought, or tolerance to limestone and to soil characteristics, should be also selected for its capacity to store copper in roots without disturbing the transfer of iron to leaves. Merlot, which has a better copper transfer to aerial parts than Cabernet Sauvignon, is also a little less sensitive to downy mildew. Future research could compare other *Vitis* species or cultivars, and a genetic approach could be used to select cultivars with better tolerance to copper stress and then extended to different crops such as orchards.

Acknowledgments

The first author is a PhD supported by the French Ministry of Agriculture via AgroParisTech. This work was partly supported by the 'Union des Grands Crus Classes de Graves'. This PhD Project is part of the framework ANR project Labex Cote. Steven Cors, Sebastien Gambier, Sylvie Bussiere and Cecile Coriou are acknowledged for their valuable technical contribution to this work.

References

- Ali N.A., Bernal M.P., Ater M., 2002. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, 239, 103-111.
- Angelova V.R., Ivanov A.S., Braikov D.M., 1999. Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil – grapevine – grape. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 713–721.
- Bravin M., 2008. Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole. Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, MontpellierSupAgro, 203 p.
- Brun L.A., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy J.C., 1998. Relationships between

extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution*, 102, 151-161.

Cambrolle J., Garcia J.L., Ocete R., Figueroa M.E., Cantos M., 2013. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. *Chemosphere*, 93, 294-301.

Chopin E.I.B., Marin B., Mkoungafoko R., Rigaux A., Hopgood M.J., Delannoy E., Cancès B., Laurain M. 2008. Factors affecting distribution and mobility of trace elements (Cu, Pb, Zn) in a perennial grapevine (*Vitis vinifera* L.) in the Champagne region of France. *Environmental Pollution*, 156, 1092-1098.

Clemens S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475-486.

Diaz I., Del Campillo M.C., Cantos M., 2009. Iron deficiency symptoms in grapevine as affected by the iron oxide and carbonate contents of model substrates. *Plant Soil*, 322, 293-302.

Gessler C., Pertot I., Perazzolli M., 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 3-44.

Grotz N., Guerinot M.L., 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 595-608.

Hall, 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 366, 1-11.

Juang K.W., Lee Y.I., Lai H.Y., Wang C.H., Chen B.C. 2012. Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1315-1322.

Kim S.A., Guerinot M.L., 2007. Mining iron : Iron uptake and transport in plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581, 2273-2280.

Ko B.G., Vogeler I., Bolan N.S., Clothier B., Green S., Kennedy J., 2007. Mobility of copper, chromium, arsenic from treated timber into grapevines. *Science of the Total Environment*, 388, 35-42.

Kopittke P.M., Menzies N.W., 2006. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil*, 279, 287-296.

Ksouri R., Gharsalli M., Lachaal M., 2004. Physiological responses of Tunisian grapevine varieties to bicarbonate-induced iron deficiency. *Journal of Plant Physiology*, 162, 335-341.

Marschner H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press, 889 p.

McBride M.B., 2001. Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *Journal of Environmental Quality*, 30, 78-84.

Michaud A.M., Bravin M.N., Galleguillos M., Hinsinger P., 2007. Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil*, 298, 99-111.

Michaud A.M., Chappellaz C., Hinsinger P., 2008. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant Soil*, 310, 151-165.

Miotto A., Ceretta C.A., Brunetto G., Nicoloso F.T., Giroto E., Farias J.G., Tiecher T.L., De Conti L., Trentin G., 2014. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. *Plant and Soil*, 374, 593-610.

Mirlean N., Roisenberg A., Chies J.O., 2007. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environmental Pollution* 149, 10-17.

Panou-Filotheou, Bosabalidis A.M., 2004 Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*). *Plant science*, 166, 1497-1504.

Poschenrieder C., Bech J., Llugany M., Pace A., Fenes E., Barcelo J., 2001. Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant and Soil*, 230, 247-256.

Romeu-Moreno A., Mas A. 1999. Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2519-2522.

Toselli M., Baldi E., Marcolini G., Malaguti D., Quartieri I.M., Sorrentini G., Marangoni B., 2008. Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 85-92.

Yruela I., 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-156.

3.2 Conséquences d'une contamination cuprique sur le métabolisme de la plante : étude de la composition de la sève

Dans la partie 3.1, nous avons mis en évidence une augmentation de la concentration en cuivre des jeunes feuilles pour une exposition des boutures à Cu 10 μM ainsi qu'un ralentissement de la croissance de ces jeunes feuilles pour le Cabernet Sauvignon. Ce cépage semble donc moins tolérant au cuivre que les deux autres. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement à ce cépage.

C'est la sève qui permet les échanges de substances organiques et qui assure le transport des éléments nutritifs entre les organes d'une plante. En cas de modification du métabolisme de la plante, on peut donc s'attendre à ce que sa composition soit modifiée. Dans cette partie, nous cherchons donc à savoir si l'exposition au cuivre modifie la composition de la sève des jeunes feuilles des boutures de Cabernet Sauvignon. Nous nous préoccupons plus particulièrement des teneurs en sucre et en acides aminés qui résultent du métabolisme primaire de la plante puisque le cuivre intervient comme oligo-élément dans la photosynthèse et la fixation de l'azote. Pour cela, nous avons utilisé le même protocole que précédemment. Nous avons exposé des boutures franches de Cabernet Sauvignon à 4 concentrations en cuivre différentes (Cu 0,2 1 2,5 et 10 μM) pendant deux semaines puis nous avons dosé le sucre et les acides aminés dans la sève exsudée des jeunes feuilles.

3.2.1 Matériels et méthodes

Dispositif expérimental d'exposition au cuivre des boutures de vigne

Contamination cuprique du substrat

Le substrat choisi est la perlite qui offre l'avantage d'être chimiquement neutre (peu d'interaction avec le cuivre, comme nous l'avons vérifié dans une expérience préliminaire comparant perlite, vermiculite et sable), avec une bonne capacité d'absorption de la solution et de restitution à la plante et qui n'abîme pas les racines.

Quatre modalités de cuivre sont testées : 0,2 μM (notre témoin qui correspond à la dose de cuivre en tant qu'oligo-élément nécessaire à la plante), 1 μM et 2,5 μM (valeurs intermédiaires) et 10 μM (dose présentant les premiers symptômes de phytotoxicité mesurables sans être létale, d'après une de nos expérimentations préliminaires).

Pour chaque modalité et pour chaque cépage, 3 kg de perlite ont été saturés par 12 litres de solution de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Merck pure 99%) puis mis à incuber à 22°C pendant 2 semaines.

Production des boutures de vigne

Les expérimentations ont été menées en serre sur 120 boutures franches de vigne de Cabernet Sauvignon produites à partir de rameaux de vigne à un œil, de 10 cm de long et âgé de 2 ans. Les rameaux sont placés dans des pots de perlite individuels sur une couche chauffante à 25°C avec un arrosage par brumisation pendant 4 semaines pour favoriser le débourrement.

Une solution nutritive (tableau 14) est réalisée dans une cuve de 1500 litres afin de maîtriser les apports de cuivre. Son pH est ajusté à 6,8 afin de garantir la bonne disponibilité du cuivre.

Tableau 14: Composition de la solution nutritive

Engrais	Concentration
$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	0,3000 g/l
KNO_3	0,1290 g/l
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,1500 g/l
$\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$	0,2500 g/l
CaCl_2	0,0555 g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 (4 \text{H}_2\text{O})$	0,1181 g/l
H_3BO_3	0,0286 g/l
$\text{MnCl}_2 (4 \text{H}_2\text{O})$	0,39 mg/l
ZnSO_4	2,20 mg/l
H_2MoO_4	0,20 mg/l
FeNaEDTA	7,34 mg/l
$\text{CuSO}_4 (4 \text{H}_2\text{O})$ soit Cu 0,2 μM	0,05 mg/l

Les boutures sont ensuite irriguées goutte à goutte à l'aide de la solution nutritive sur des tableurs sans plaque chauffante, en serre.

Exposition au cuivre des boutures de vigne

Les boutures sont rempotées à l'âge de 6 semaines dans de la perlite préalablement contaminée au sulfate de cuivre. Elles sont ensuite irriguées goutte à goutte avec la solution nutritive à laquelle une pompe doseuse (dosatron®) réglée à 1%, ajoute la dose adéquate de solution de sulfate de cuivre pour éviter toute dilution due à l'irrigation (Figure 61).



Figure 61: Schéma du dispositif expérimental

Durant les quinze jours d'exposition en cuivre variable, les boutures ont été sevrées en fer afin d'éviter que le complexe EDTA n'interfère avec le cuivre. Au bout de deux semaines d'exposition au cuivre, les feuilles des boutures sont récoltées.

Collecte de sève

Pour chaque modalité, 24 feuilles F1 et 24 feuilles F0 avec leur pétiole ont été prélevées à l'aide d'un scalpel désinfecté à l'éthanol. L'extrémité du pétiole placée sur une goutte d'EDTA à 20 mM est redécoupée proprement à 1,5 cm de la base de la feuille. Puis la feuille est rapidement placée dans un tube de collecte contenant 200 µl d'EDTA à 20 mM et ajusté à pH 7. Le tube est rebouché hermétiquement avec du parafilm pour limiter l'évapotranspiration. Par sécurité et afin de garantir une saturation en humidité de l'air ambiant, et donc une éventuelle évapotranspiration, les tubes sont placés dans un bac de polystyrène contenant du KH_2PO_4 , fermé hermétiquement avec du film plastique alimentaire Cellofrais®. L'exsudation de la sève est réalisée en condition d'humidité saturante : Les bacs polystyrène sont placés pendant 20 h dans des chambres climatiques à 22°C et 99% d'humidité relative avec une photopériode jour/nuit de 16/8heures, La phase d'obscurité évitant la translocation de l'EDTA dans l'apoplasme. A la fin de l'exsudation, la feuille est retirée, l'exsudat est agité puis 50 µl sont prélevés pour le dosage du saccharose. Le reste est utilisé pour le dosage des acides aminés. L'exsudat récolté est essentiellement composé de phloème mais on ne peut pas exclure qu'il contienne également des traces de xylème.

L'exsudat de sève de feuilles matures F3 était initialement prévu mais une panne des chambres climatiques n'a pas permis de récolter suffisamment d'exsudat pour que les résultats soient exploitables.

Dosages d'acides aminés et de sucres de feuilles de vigne

Pour les acides aminés, 500 µl d'éthanol sont ajoutés à l'exsudat puis l'échantillon est évaporé sous vide à l'aide d'un speedvac à 30°C pendant une heure. Les échantillons sont ensuite stockés à -20°C. Chaque exsudat est repris dans 30 µl d'acide chlorhydrique à 0,1mol/l. La composition en acides aminés est déterminée par chromatographie liquide en polarité à phase inverse (HPLC) Hewlett Packard® Agilent serie 1100 et une colonne Zorbax® Eclipse C18 AAA 4,6*150 mm à 40°C. La dérivation des acides aminés est réalisée majoritairement à l'aide d'o-phtaldialdéhyde (OPA) sauf pour la proline (fluorénylméthoxycarbonyl, FMOC). La détection des acides aminés et l'identité s'effectuent à l'aide d'un détecteur à barrette de diode (DAD) à 262 nm pour la proline et à 338 nm pour les autres. Le standard de référence utilisé est le standard de 17 acides aminés à 250 nmol/µl (Agilent Technologies®) additionné du kit complémentaire en acides aminés (Agilent Technologies®) supplémenté en asparagine, glutamine et tryptophane selon la méthode mise au point par Chuche (Chuche et al., 2014).

Pour le saccharose, l'exsudat est hydrolysé en glucose à l'aide de 10 µl d'invertase à 10 unités/ml (Sigma®) dans une solution tampon d'acétate à 100 mmol/l à pH 4,5 et à 37°C pendant 30 minutes. Le dosage du glucose est réalisé à l'aide du Kit enzymatique Glucose Go Assay Kit (Sigma®) en spectrophotométrie à 540 nm grâce à un étalon standard de glucose à 1mg/ml.

Analyses statistiques

Les résultats sur les teneurs en sucre et en acides aminés des exsudats de sève des feuilles de vigne sont analysés à l'aide du logiciel R version 1.65. L'ensemble des données concernant les acides aminés ont été préalablement standardisées par une transformation logarithmique. Les tests de Shapiro-Wilk et Levène montrent que ces données suivent une loi normale et ont une homogénéité des variances permettant de traiter les données à l'aide d'une analyse de variance puis de les comparer à l'aide du test post-hoc de Tukey.

3.2.2 Résultats

3.2.2.1 Influence de la contamination cuprique sur la teneur en sucres dans la sève des feuilles de Cabernet Sauvignon

La teneur en saccharose dans la sève des très jeunes feuilles F0 est quatre fois plus faible en moyenne ($15,9 \pm 3,0 \mu\text{g/l}$) que celle de l'étage foliaire F1 ($67,2 \pm 8,6 \mu\text{g/l}$) situé juste en dessous ($p=0,0219$). Il n'y a pas de différence des teneurs en saccharose dans la sève des feuilles F0 ou F1 en fonction du niveau d'exposition au cuivre des boutures de Cabernet Sauvignon (figure 62).

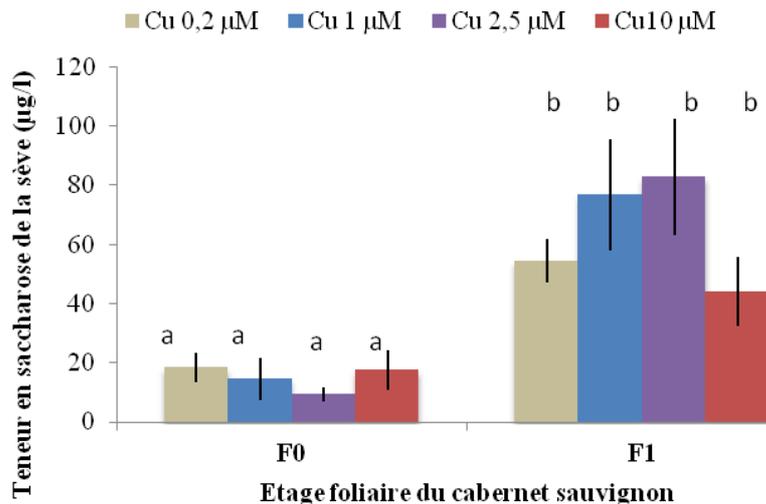


Figure 62: Teneur en saccharose dans la sève élaborée des jeunes feuilles F0 et F1 de Cabernet Sauvignon en fonction de la contamination cuprique du substrat des boutures de vigne (moyenne \pm erreur standard).

3.2.2.2 Influence de la contamination cuprique sur la teneur en acides aminés dans la sève des feuilles de Cabernet Sauvignon

Dans les boutures témoins (Cu 0,2 µM) la teneur en acides aminés est la même pour les feuilles F0 et F1. Lorsque l'exposition au cuivre des boutures augmente, la teneur en acides aminés des feuilles F1 reste stable tandis qu'elle augmente pour les très jeunes feuilles F0 mais cette augmentation n'est pas significative (figure 63).

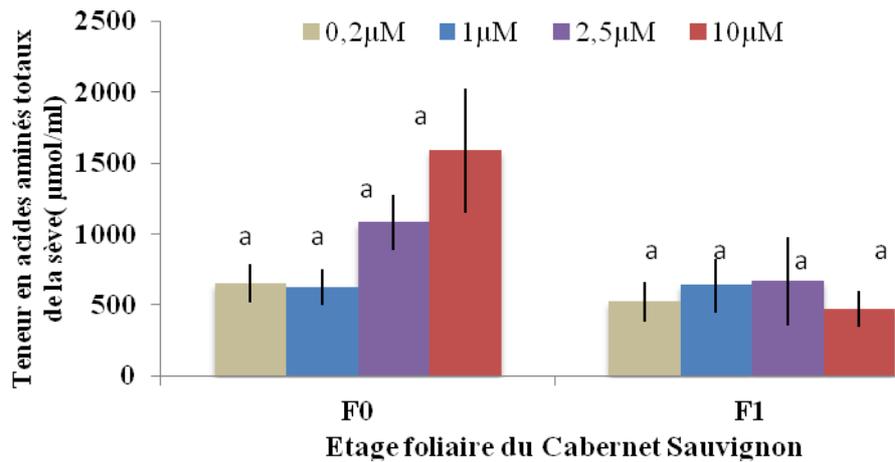
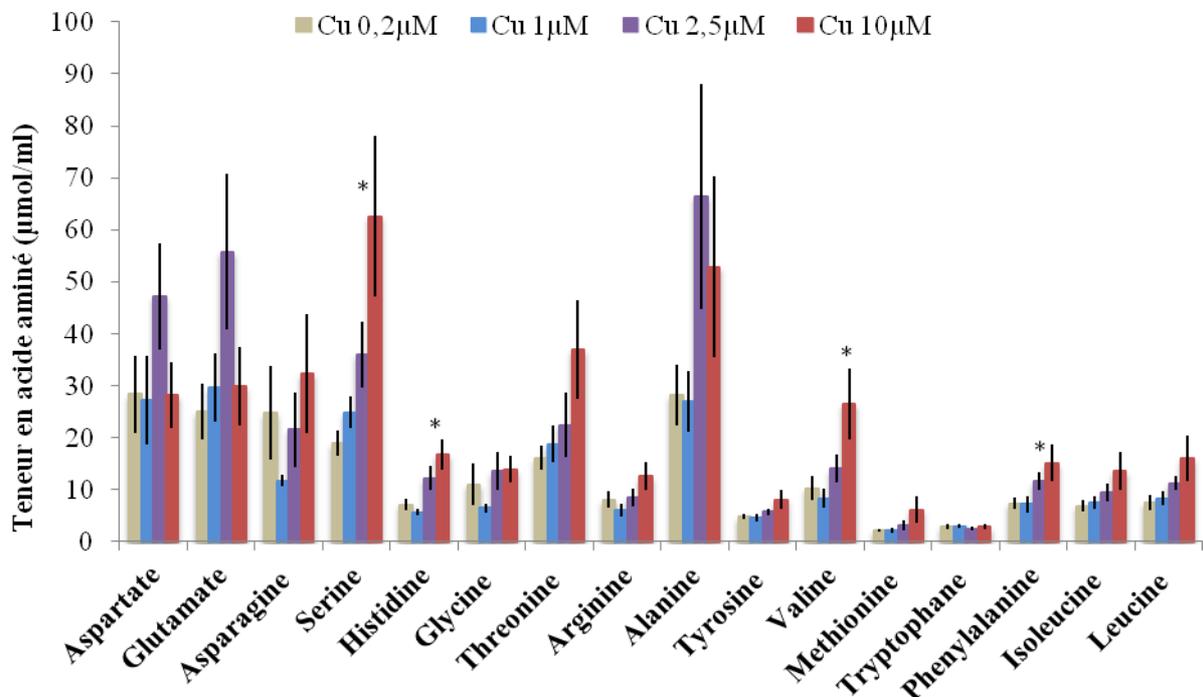


Figure 63: Teneur en acides aminés totaux de la sève de jeunes feuilles F0 et F1 de Cabernet Sauvignon en fonction de l'exposition au cuivre des boutures (moyennes ± erreur standard)

Si on s'intéresse un peu plus en détail à la teneur de chaque acide aminé dans la sève, il n'y a pas de différence significative des teneurs de chaque acide aminé entre F0 et F1 pour les boutures témoins, même si les teneurs tendent à être plus élevée pour l'asparagine, la glycine, la thréonine, l'arginine et la cystine et plus faible pour la proline dans la sève de F0 que dans F1.

Lorsque l'exposition au cuivre des boutures augmente, aucune différence significative des teneurs pour chaque acide aminé n'a été mise en évidence dans la sève des feuilles F1. Par contre, des différences de teneurs de quelques acides aminés apparaissent pour F0 lorsque l'exposition augmente (figure 64).



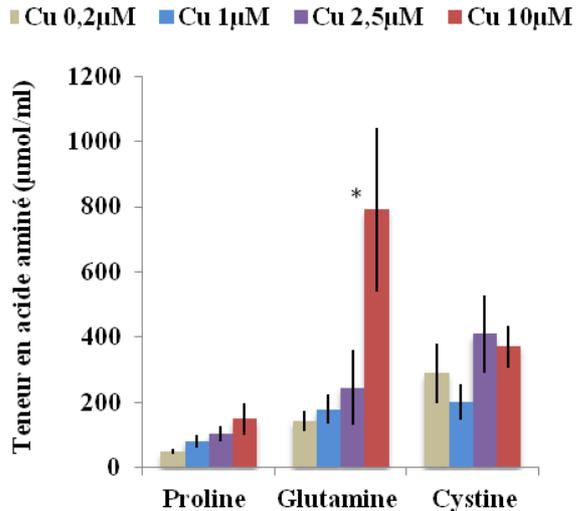


Figure 64: Teneur de 19 acides aminés dans la sève de jeunes feuilles F0 de Cabernet Sauvignon en fonction de l'exposition au cuivre des boutures (moyenne \pm erreur standard, * signifie une différence entre les teneurs d'une même acide aminé avec $P < 0,05$)

Pour chacun des 19 acides aminés, il n'y a pas de différence de teneurs entre une exposition au cuivre à 0,2 et 1 μM . On constate une augmentation significative de la teneur à partir d'une exposition au cuivre à 2,5 μM pour l'histidine et la phénylalanine et à partir de Cu 10 μM pour la serine, la valine et la glutamine par rapport aux boutures témoins. Les teneurs des autres acides aminés restent stables à ces niveaux d'expositions.

3.2.3 Discussion

Il existe des variations des teneurs en sucres et en acides aminés en fonction des espèces végétales, voire des variétés au sein d'une même espèce (Wilkinson et al., 2003). Sur les 16 espèces étudiées par ces auteurs, seules les concentrations relatives en histidine, en thréonine, en tryptophane et en valine ont augmentées, les valeurs concernant les autres acides aminés restant inchangées. Ce sont donc davantage les concentrations relatives en acides aminés que la quantité en acides aminés totale qui changent d'une espèce végétale à l'autre. Toutefois, les besoins de la plante évoluent au cours du temps, c'est pourquoi, les teneurs en sucre et en acides aminés ainsi que l'allocation de la ressource entre les organes, fluctuent au cours de la saison et en fonction des stades phénologiques pour une même espèce. Ainsi, Bi et al (2007) ont montré que la teneur en sucres et en acides aminés dans les feuilles d'orangers et de citronniers diminuent entre novembre et avril puis augmentent pendant la saison chaude. Pendant la période végétative, la teneur en acides aminés est plus élevée dans les feuilles en croissance que dans les feuilles âgées tandis que c'est le contraire pour les teneurs en sucre (Bi et al., 2007). La diminution de la teneur en sucres des feuilles en fin d'été est due à l'exportation du sucre vers les fruits essentiellement sous forme de saccharose (Swanson et Elshishiny, 1958 cité par Xie et al., 2009b) où il est ensuite hydrolysé en glucose et fructose (Xie et al., 2009b).

Nos résultats sur les boutures témoins (Cu 0,2 μM) montrent également une augmentation de la teneur en sucre de la sève des feuilles au fur et à mesure de leur maturité, les feuilles F0 apparues plus récemment que les feuilles F1, ont une teneur en glucose moins élevée. Le même constat a été fait sur le cépage Savatiano où les feuilles immatures ont une teneur en saccharose plus faible que les feuilles âgées (Pakatas et Noitsakis, 2001). Nous n'observons pas de modification des teneurs en sucres de la sève des feuilles (F0 et F1) de Cabernet

Sauvignon lorsque l'exposition au cuivre des boutures augmente, conformément à ce que avait été montré également pour le Sauvignon (Romeu-Moreno et Mas, 1999), tandis qu'une augmentation de la teneurs en saccharose a été mesurée pour le Vinhão (Martins et al., 2014a).

Cette différence pourrait être due aux cépages utilisés lors des ces trois expériences. Il est possible également que le stress cuprique influence la teneur en sucres des feuilles lorsqu'il appliqué sur les feuilles en tant que fongicide cuprique (Martins et al., 2014) mais pas suite à une contamination en cuivre du substrat comme le montre nos résultats et ceux de Romeu-Moreno et Mas (1999).

Un stress hydrique peut entrainer une modification des teneurs en sucre des feuilles comme cela a été démontré pour le cépage Savatiano (*V. vinifera*) avec une augmentation de la teneur en glucose et en fructose des feuilles immatures mais sans modification de ces teneurs pour les feuilles âgées (Pakatas et Noitsakis, 2001) tandis qu'aucune différence des teneurs en sucres solubles n'a été observée pour les deux porte-greffes M4 (*V. vinifera* x *V. berlandieri*) et 101.14 (*V. riparia* x *V. rupestris*) (Meggio et al., 2014). Un stress hydrique ne semble donc pas induire les mêmes conséquences selon les différentes espèces de *Vitis* et leurs hybrides. Or, une contamination cuprique élevée du sol peut entrainer un stress oxydant comparable à un stress hydrique et une perturbation de la photosynthèse (Cambrolle et al., 2013, Rouphael et al., 2008), de la conductance stomatique (Rouphael et al., 2008) pouvant provoquer une diminution du flux de sève de 60 % (Romeu-Moreno et Mas, 1999).

Cependant, nous n'avons pas mesuré de différence de teneurs en sucre dans la sève des feuilles bien que nous ayons constaté un ralentissement de la croissance des feuilles (Cabernet Sauvignon) lorsque le niveau d'exposition au cuivre augmente. L'excès de sucre pourrait être stocké directement dans le tissu mésophyllien des feuilles sous forme d'amidon (Pasternes et al., 2014) et peu transporté par la sève, ce qui expliquerait nos résultats. Pour étayer cette hypothèse, les teneurs en sucres sous ses différentes formes (glucose, fructose, amidon) pourraient être mesurées à la fois dans le limbe de la feuille et dans la sève. Mais nos résultats pourraient aussi s'expliquer simplement par une exposition trop faible pour entrainer ces modifications sur le métabolisme carboné de la plante.

En ce qui concerne les acides aminés, nos résultats ne montrent pas de différence de quantités d'acides aminés totaux dans la sève entre les feuilles F0 et F1 de Cabernet Sauvignon, de même qu'aucune différence en acides aminés totaux n'a été trouvé entre les feuilles immatures et âgées de Savatiano (Pakatas et Noitsakis, 2001) ou entre des jeunes et vieux vergers (Bi et al., 2007) bien que la teneur en azote diminue généralement au fur et à mesure de l'avancée dans les stades phénologiques (Benito et al., 2013). Il semble que ce soit davantage la variation de teneur en certains acides aminés plutôt qu'en acides aminés totaux qui explique ces différences entre les stades phénologiques. Toutefois, comme nos deux étages foliaires (F0 et F1) sont proches, il est possible que cette différence se serait exprimée davantage entre des feuilles d'étages foliaires plus éloignés.

Lorsque l'exposition au cuivre des boutures de Cabernet Sauvignon augmente, nous ne constatons pas de différence de teneurs pour 19 acides aminés dans la sève de F1, tandis qu'une augmentation des teneurs de 5 acides aminés (glutamine, sérine, histidine, valine et phénylalanine) est mesurée dans la sève de feuilles F0. Ceci explique que la teneur en acides aminés totaux tend à augmenter pour F0 au fur et à mesure que le niveau d'exposition au cuivre du substrat augmente, même si là encore elle n'est pas significative. De même, peu de changement dans la teneur en acides aminés, excepté une augmentation en phénylalanine et en isoleucine a été mesuré dans les feuilles de Vinhão après traitement cuprique (Martins et al., 2014). Dans les deux cas, il y a augmentation de la teneur en phénylalanine.

Or on sait que la phénylalanine ammonia lyase intervient dans le système de défense des plantes en cas de stress environnemental (Petit et al., 2009), ce qui pourrait expliquer cette augmentation en phénylalanine. La phénylalanine intervient dans la voie des phénylpropanoïdes notamment dans la synthèse de molécules de défense comme les composés phénoliques et les alcaloïdes (Pasquier, 2012) mais elle est également synthétisée en cas de stress osmotique (Shen et al., 1989). Or un stress métallique est souvent perçu comme un stress hydrique par les plantes.

De plus, nos résultats montrent une augmentation des teneurs en serine et en valine qui interviennent également en cas de stress hydrique. La serine intervient dans la synthèse d'un osmo-protecteur en tant que précurseur de la glycine bêtaïne (Mansour, 2000 cité par Pasquier 2012) et la valine intervient comme molécule signal de régulation de l'expression de certains gènes en cas de déshydratation (Nambara et al., 1998, cité par Pasquier, 2012).

Nous avons également mesuré une augmentation de la teneur en glutamine, une des trois principaux supports d'azote organiques des plantes (Mifflin et Lea, 1980 cité par Llorens et al., 2000) et qui est impliqué dans la métabolisation de l'azote à partir d'ammonium (Llorens et al., 2000). Cette seconde voie métabolique de l'azote intervient en cas de déficit en nitrate, la source principale d'azote des plantes normalement. Or, un excès de cuivre diminue l'activité de la nitrate réductase et donc de nitrates dans les racines (Llorens et al., 2000). L'augmentation de la teneur en glutamine que nous observons serait donc un signe de perturbation de la voie principale d'assimilation de l'azote. L'activation de la seconde voie d'assimilation de l'azote à partir d'ammoniaque et en recyclant la glutamine comme ressource interne d'azote, serait un moyen utilisé par la plante pour compenser le dysfonctionnement de la voie principale d'assimilation. Toutefois, cette seconde voie moins sensible au cuivre mais moins efficace ne permet pas de compenser les conséquences d'une diminution d'assimilation d'azote provoquée par une contamination cuprique sur le long terme ou à des niveaux élevés: la diminution de la teneur en azote totale a ainsi été mesurée sur Sauvignon après 3 mois d'exposition (Llorens et al., 2000) et sur *Sylvestris* au delà d'une contamination cuprique de 23 mmol/l (Cambrolle et al., 2013). La glutamine est également impliquée dans la molécule de glutathion (Glu-Cys-Gly), à partir de laquelle se forment les phytochélatines, capable de stocker les métaux. La synthèse de glutathion est alors logiquement favorisée par une exposition métallique. L'augmentation de la concentration en glutamine serait alors aussi le signe indirect d'une augmentation de la synthèse de phytochélatines ou de leur transport via la sève.

En outre, le transport du cuivre vers les parties aériennes est également assuré par des acides aminés comme l'histidine avec laquelle il est complexé (Clemens, 2001). L'augmentation de la teneur en cuivre des feuilles, associée à l'augmentation de la teneur en histidine de la sève que nous avons mesurées corrobore cette hypothèse.

En revanche, nous ne mesurons pas d'augmentation significative de la teneur en proline bien que l'accumulation de proline soit couramment observée lors de stress environnementaux comme la présence de métaux lourds, le stress oxydatif, la sécheresse (Schat et al., 1997, Choudhary et al., 2005, Yang et al., 2009) mais également en cas de stress biotique (Pasquier, 2012). Les concentrations en cuivre que nous avons testées sont moins élevées que celles couramment testées dans d'autres études, ce qui pourrait expliquer que nous n'observons pas d'augmentation de proline qui correspond probablement à un niveau de stress supérieur. La réponse du Cabernet Sauvignon au stress cuprique pourrait être graduelle en fonction du niveau ou de la durée d'exposition cuprique.

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il existe des différences de distribution du cuivre entre les organes, selon les cépages et les espèces de *Vitis* : le 101.14 stocke davantage de cuivre dans les racines que le Cabernet Sauvignon et le Merlot mais la translocation du cuivre vers

les feuilles est plus importante pour le Merlot. En cas de contamination importante du substrat à Cu 10 μM , la concentration en cuivre dans les jeunes organes augmente pour tous les cépages. Ce sont donc les jeunes organes les premiers impactés par cette contamination cuprique. Au bout de deux semaines d'exposition, nous constatons déjà une modification du métabolisme des jeunes feuilles de Cabernet Sauvignon avec une augmentation de la teneur en 5 acides aminés de la sève tandis qu'il n'y a pas de modification de la teneur en saccharose ni de la concentration en fer. Les acides aminés dont la teneur augmente sont principalement impliqués dans les processus de réponse à un stress cuprique (glutamine, histidine, phénylalanine), à un stress hydrique (valine, serine, phénylalanine) et à une déficience d'assimilation de l'azote (glutamine). Nous observons donc une modification du métabolisme de l'azote avant que la photosynthèse ne soit perturbée, et qui se traduit par un ralentissement de la croissance des jeunes feuilles, en réponse à un stress cuprique.

Le chapitre suivant analysera si ces premières modifications engendrées par une contamination cuprique de la vigne modifient les interactions entre la vigne et ses bio-agresseurs.

Chapitre 4 : Effets du cuivre circulant dans la vigne sur quelques bio-agresseurs

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la contamination cuprique des sols viticoles entraînait une augmentation de la teneur en cuivre dans la vigne, surtout dans les racines, et dans une moindre mesure dans les parties aériennes. Nous avons également montré que cette contamination cuprique engendre des perturbations dans le métabolisme de la plante bien que les symptômes de cette phytotoxicité ne soient pas encore visibles, notamment en modifiant la croissance foliaire et la teneur en acides aminés de la sève. Or les bio-agresseurs sont sensibles à la vigueur, l'architecture la couleur et les qualités nutritives de leur plante hôte. Il est donc légitime d'analyser l'influence du cuivre circulant et des modifications induites dans la plante sur les bio-agresseurs. Des modifications de ces facteurs pourraient influencer la reconnaissance de leur plante hôte par les bio-agresseurs. Nous nous limitons dans cette étude aux bio-agresseurs des parties aériennes (feuilles et tronc).

Dans ce chapitre, nous présentons les expérimentations destinées à déterminer si quelques bio-agresseurs sont influencés par la contamination cuprique de la plante (figure 65).

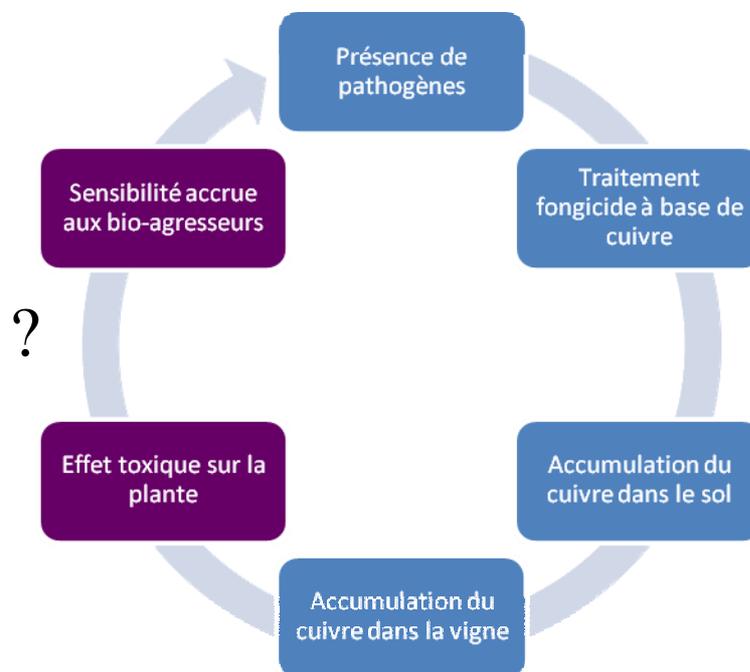


Figure 65: Question traitée dans ce chapitre par rapport au cadre générale de la thèse

Pour estimer l'impact de cette contamination sur les interactions vigne-bio-agresseurs, nous avons sélectionné trois bio-agresseurs modèles :

- *Plasmopara viticola* qui pénètre par les stomates et franchit les parois végétales, pour se nourrir dans les cellules végétales voisines. Il pourrait être défavorisé par un stress métallique de la plante. Ce type de stress entraîne en effet la fermeture des stomates, et conduit en cas de forte contamination, à une rigidification des parois, mais également à une modification de la qualité nutritive des cellules végétales.
- *Botryosphaeria sp.* dont le pouvoir pathogène latent s'exprime suite à un stress biotique et/ou abiotique subi par la plante, notamment un stress hydrique. Il pourrait donc être favorisé par un stress métallique.
- Enfin, *S. titanus*, un insecte piqueur suceur qui choisit sa plante hôte sur des critères morphologiques et gustatifs (surface foliaire et sève). Il pourrait être influencé par une modification morphologique des feuilles, un épaissement de la cuticule ou une modification de la composition chimique de la sève. De telles modifications pourraient être induites par un excès de métaux dans le sol.

Pour cela, nous avons réalisé un test de choix avec *S. titanus* entre des boutures de Cabernet Sauvignon exposées à quatre concentrations de cuivre testées dans le chapitre 3 analysant l'effet du cuivre sur la plante.

Nous avons également inoculé *P. viticola* sur des disques de feuilles de Cabernet Sauvignon et de Merlot exposées à chacune de ces concentrations en conditions contrôlées puis nous avons évalué la croissance de l'oomycète et l'intensité de sporulation.

Enfin, nous avons inoculé des plants de Cabernet Sauvignon avec des cultures de *Botryosphaeria sp.* Ces plants étaient greffés sur du 101.14 et cultivés dans 3 sols issus des parcelles analysées dans le chapitre 2 et présentant des teneurs en cuivre croissantes. Nous avons mesuré les nécroses provoquées par ces champignons et évalué les éventuelles modifications induites sur les communautés endophytes dans différents organes de la vigne.

4.1 Effets d'une contamination cuprique de la vigne sur l'attractivité de *Scaphoideus titanus*

Dans cette partie, nous cherchons à déterminer dans quelle mesure l'exposition au cuivre des boutures de Cabernet Sauvignon modifie leur attractivité pour les larves de *S. titanus*. Pour cela, nous avons réalisé un test de choix entre 4 boutures de vigne exposées préalablement à des concentrations différentes de cuivre. Nous estimons qu'au delà de 24 heures, la larve a pu faire son choix et s'installer sur la bouture qui lui convient le mieux pour s'alimenter. Nous avons montré dans la partie 3.1 du chapitre 3 que les effets d'une exposition au cuivre pouvait entraîner des variations des concentrations en cuivre et en acides aminés de certains organes aériens, cibles des larves de *S. titanus*, c'est pourquoi nous avons aussi noté l'étage foliaire sur lequel les larves s'étaient installées.

4.1.1 Matériels et méthodes

Production et contamination des boutures de vigne

Le dispositif expérimental de l'exposition au cuivre des boutures de vigne est décrit dans le chapitre 3.

*Collecte et éclosion de populations de larves de *S. titanus**

Des sarments de vigne âgés de deux ans ont été prélevés de janvier à février 2012 sur trois parcelles où des cicadelles de la flavescence dorée étaient présentes les années précédentes et où aucun traitement insecticide n'a été effectué: une parcelle de Cabernet Sauvignon à Léogéats (Gironde) et deux parcelles de Pinot noir l'une à Meursault (Saône et Loire) et l'autre à Haut Moroges (Saône et Loire). On considère donc trois populations de cicadelles différentes. Les sarments sont tronçonnés en morceaux de 20 cm de long puis stockés en chambre froide à 4°C dans des sacs plastiques jusqu'à leur utilisation.

Pour faire éclore les œufs de *S. titanus*, 2 kg de sarments sont placés sur de la vermiculite dans des mini-serres en plastique (50x38x36 cm) en mai. Les mini serres sont placées dans une chambre d'élevage maintenue à 23°C, avec une humidité relative de 70% et une photopériode jour/nuit de 16/8 heures.

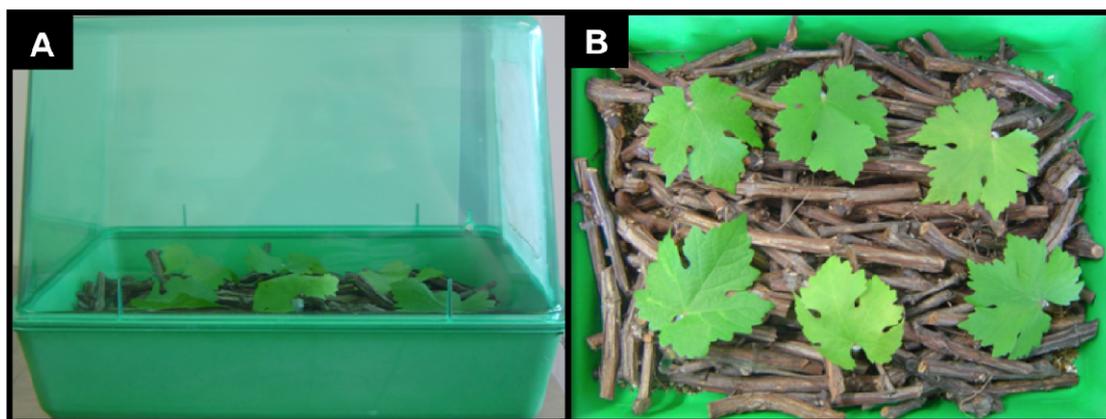


Figure 66: Cage d'éclosion en vue latérale (A) et de dessus (B) (Chuche, 2010)

Les sarments sont vaporisés toutes les semaines avec 50 ml d'eau afin d'éviter la dessiccation des œufs. Il n'est pas possible de connaître à l'avance le nombre d'œufs présents sur les bois car cela nécessiterait d'écarter les rameaux pour pouvoir compter les œufs au risque de les détruire. Afin d'avoir un nombre suffisant de larves deux mini-serres ont été affectées pour chaque population de *S. titanus*. Après trois semaines, des feuilles de Cabernet Sauvignon dont le pétiole est placé dans un tube à essai contenant de l'eau sont déposées au dessus des sarments dans les mini-serres (figure 66). Elles permettront aux larves de *S. titanus* de se nourrir. Elles sont renouvelées dès le début de leur flétrissement. L'éclosion des œufs démarre après 4 semaines et s'étale sur un mois environ. Les premières larves sont prélevées au bout de 6 semaines : ce sont donc majoritairement des larves au stade L2-L3 qui sont utilisées lors de l'expérimentation en juin.

Test de choix des larves de S. titanus entre des boutures de vigne exposées au cuivre

Trois cages cubiques de 1m de côté sont placées dans une chambre d'élevage, maintenue à $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une alternance jour/nuit de 16/8 heures. Chaque cage comporte 3 côtés en altuglass® transparent et un côté en tissu moustiquaire ouvrable. Le fond de la cage est recouvert d'un revêtement plastique noir afin de mieux distinguer les larves jaunes de *S. titanus*. Quatre boutures en pot (une par modalité) sont placées à chaque coin de la cage (figure 67A). Les boutures utilisées sont prélevées en serre le jour même et ne sont utilisées qu'une seule fois. Pour éviter tout effet environnement (lumière, courant d'air de la climatisation ou la proximité de l'ouverture de la cage) la disposition des pots dans la cage est modifiée chaque jour lors du renouvellement des pots. 35 larves de cicadelles d'une même population sont prélevées sur les feuilles dans les mini-serres d'éclosion à l'aide d'un aspirateur à bouche entomologique puis sont lâchées au centre de la cage. Chaque jour, une nouvelle cage est affectée à une population, de sorte que les trois populations de cicadelles soient testées en même temps. L'expérimentation a été répétée 8 fois en deux semaines.

Après 24 heures, les larves sont comptabilisées sur chaque étage foliaire et sur la tige de chaque bouture (figure 67B). Si la somme fait moins de 35 larves par cage, les cicadelles manquantes sont considérées comme mortes. Nous considérons qu'après 24 heures, la larve a eu le temps de tester les différentes boutures et s'est installée sur celle qui lui convient le mieux. Pour éviter tout effet d'apprentissage des individus, de nouvelles larves sont utilisées chaque jour. De même, les boutures de vigne sont renouvelées quotidiennement. Nous considérons qu'après 24 heures, la larve a eu le temps de tester les différentes boutures et s'est installée sur celle qui lui convient le mieux. Pour éviter tout effet d'apprentissage des individus, de nouvelles larves sont utilisées chaque jour. De même, les boutures de vigne sont renouvelées quotidiennement.

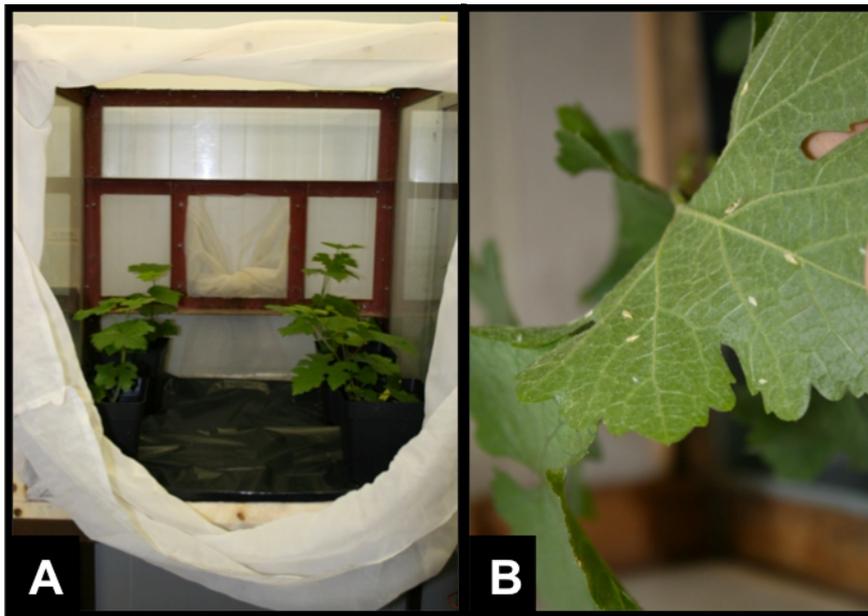


Figure 67: Cage utilisée pour le test de choix (A) et comptage des cicadelles sur feuille de Cabernet Sauvignon (B)

A la fin de l'expérience, nous avons réalisé des exsudations de sève élaborée à partir des feuilles des boutures de chaque modalité utilisées lors du test de choix, dans des enceintes climatiques programmées Conviron®, afin d'analyser leur composition en acides aminés (HPLC) et en sucres (Kit enzymatique). Ce protocole et les résultats obtenus ont été décrits dans le chapitre 3.

Analyses statistiques

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel R version 1.65. Les tests du Chi2 ont été utilisés pour traiter les données.

4.1.2 Résultats

4.1.2.1 Choix de *S.titanus* entre des boutures de Cabernet Sauvignon exposées à différentes concentrations de cuivre

Il y a une différence significative de fréquentation par les larves de cicadelles des boutures de vigne en fonction de leur exposition au cuivre en cuivre ($P < 0,01$) (figure 68). A Cu 10 μM , on observe une diminution significative de fréquentation des plantes par rapport aux boutures témoins et aux boutures exposées à Cu 1 μM . Les boutures exposées à Cu 2,5 μM sont également nettement moins fréquentées que les boutures à Cu 1 μM .

Les plantes contaminées à Cu 1 μM semblent davantage fréquentées que les plantes témoins, ce qui suggère une adaptation des cicadelles à leur environnement.

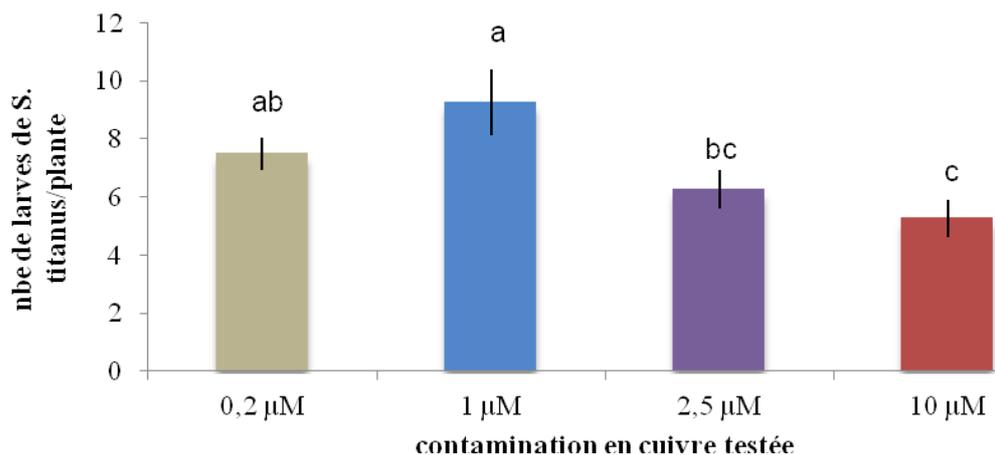


Figure 68: Nombre moyen de larves de *S. titanus* par plante en fonction du niveau de contamination cuprique du substrat (moyenne ± erreur standard). Les barres créditées de lettres identiques ne sont pas différentes ($P < 0.05$)

4.1.2.2 Répartition de *S. titanus* entre les étages foliaires des boutures de vigne en fonction de leur exposition au cuivre

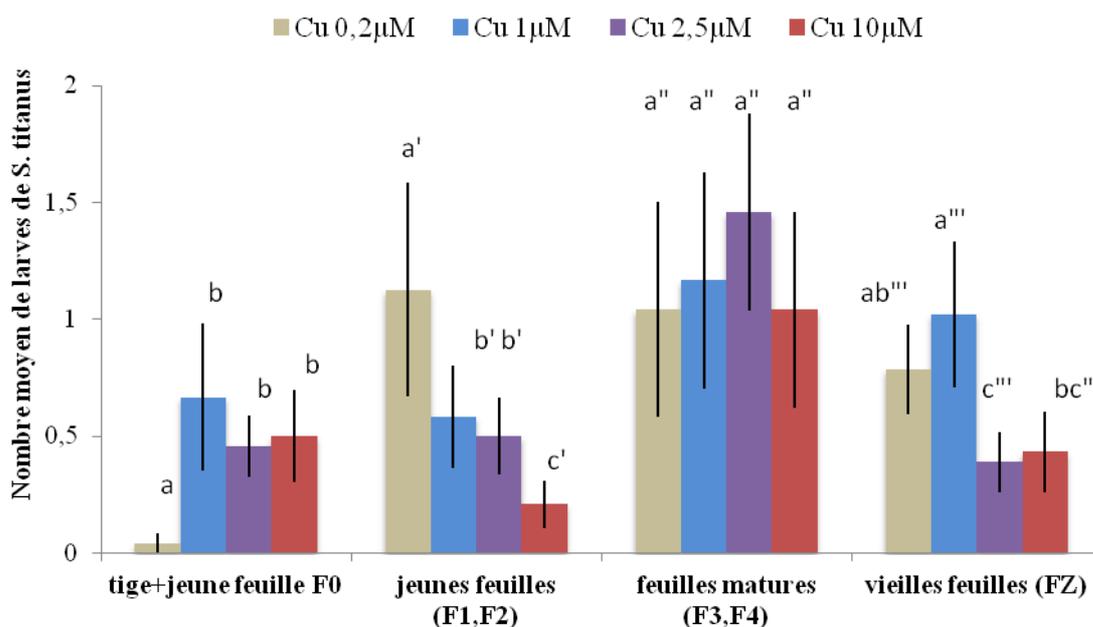


Figure 69: Répartition des larves de *S. titanus* en fonction du niveau d'exposition au cuivre des boutures de Cabernet Sauvignon (moyenne ± erreur standard)

Sur les boutures témoins, *S. titanus* est peu présent sur les tiges les très jeunes feuilles F0 mais se répartit indifféremment sur les autres étages foliaires (figure 69). Par contre sa répartition sur la plante change lorsque la bouture est davantage exposée au cuivre. Ainsi, les larves s'installent davantage sur les très jeunes feuilles F0 et les tiges des boutures contaminées par rapport au boutures témoins ($P < 0,01$). Au contraire, les jeunes feuilles (F1 et F2) et les vieilles feuilles (FZ) sont moins fréquentées sur les boutures les plus contaminées ($P < 0,05$) Enfin, leur répartition sur les feuilles matures (F3 et F4) varie peu quelque soit l'exposition au cuivre des boutures et ces étages foliaires restent les plus fréquentés.

4.1.2.3 Importance de l'origine géographique des insectes

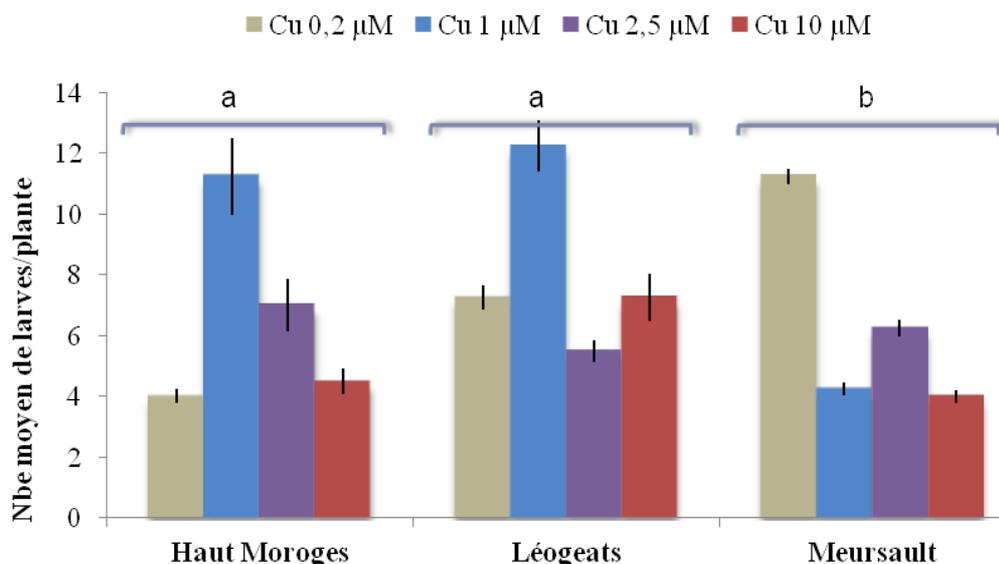


Figure 70: Nombre de larves de *S. titanus* par plante en fonction de la contamination cuprique du substrat et de l'origine géographique des larves (moyenne \pm erreur standard). Les lettres identiques ne sont pas différentes ($P < 0.05$)

La population de *S. titanus* originaire de Meursault choisit significativement des plantes contaminées en cuivre différentes des populations de *S. titanus* originaire de Léogeats ou Haut Moroges ($P < 0,001$) (figure 70). Les populations originaires de Léogeats et Haut Moroges s'installent plutôt sur des vignes contaminées à Cu 1 μ M tandis que celles de Meursault choisissent davantage les plantes témoins (Cu 0,2 μ M).

Pour les trois populations, il apparaît une différence significative entre la modalité préférée par les larves de cicadelles et la modalité 10 μ M.

4.1.3 Discussion

Nos résultats montrent que les cicadelles préfèrent des modalités différentes en fonction de leurs origines. Or, les larves que nous avons utilisées pour cette expérimentation proviennent d'œufs pondus par des populations naturelles de femelles sur des sarments provenant de parcelles viticoles en production. Il est donc possible que chacune de ces populations naturelles soit adaptées aux pratiques fongicides et aux traitements cupriques des parcelles dont elles sont issues. Les œufs pondus en été, peuvent avoir reçu des pulvérisations de cuivre, ce qui pourrait modifier la sensibilité ultérieure des larves. La préférence des larves de Léogeats et de Haut Moroges pour les boutures contaminées à Cu 1 μ M plutôt que pour les boutures témoins, pourrait s'expliquer par une fréquence des traitements cupriques plus importante sur les parcelles dont elles sont issues. À l'inverse, il est possible que les parcelles de Meursault soient moins traitées, ce qui expliquerait la préférence des larves originaires de Meursault pour les boutures témoins. À notre connaissance aucun effet d'empreinte au stade juvénile n'a été observé chez *S. Titanus* (Chuche et Thiéry, 2014).

Quelle que soit l'origine de la population, nos résultats montrent une baisse de fréquence des plantes les plus contaminées, et cela pour des niveaux d'exposition au cuivre (Cu 0,2 à 10 μ M) similaires aux niveaux d'exposition trouvés dans les parcelles viticoles de Pessac-Léognan (Cu 0,1 à 7,5 μ M) (cf. chapitre 2). Ce résultat est intéressant et assez original étant donné que l'influence de contaminations en cuivre sur des insectes est assez peu étudiée. Or, le cuivre est un oligo-élément pour les insectes qui en ont besoin en très petite quantité (Parra

1990 cité par Bastos et al., 2007) car c'est un constituant de la tyrosinase, un composant de l'hémolymphe (Chapman, 1982, d'après Larsen et al., 1994). Les insectes possèdent donc des mécanismes physiologiques pour réguler la quantité de Cu dans leur corps (Lindqvist, 1992). La quantité de cuivre dans l'arpeuteuse du chou *Trichoplusia ni* reste constante quelque soit le niveau de contamination en cuivre du brocoli sur lequel elles se nourrissent (Larsen et al. 1994). Pourtant, les besoins en cuivre et la sensibilité au cuivre varient en fonction des espèces d'insectes. Par exemple, la durée de vie et le taux de reproduction de *Drosophila melanogaster* diminuent suite à leur exposition à des traitements cupriques (Marchalsegault et al., 1990). Une saturation en cuivre des organes du mésenteron et des tubes de Malpighi destinés à la détoxification a été mesurée, conduisant à l'accumulation inhabituelle de cuivre dans les organes reproducteurs et la graisse corporelle (Marchalsegault et al., 1990). Le processus de régulation du cuivre chez les insectes peut donc être perturbé en cas de fortes contaminations et induire des effets délétères. Ceci pourrait expliquer pourquoi au cours de notre expérimentation, les boutures les plus contaminées sont moins fréquentées. Par ailleurs, la sensibilité aux oligo-éléments varie également au cours du stade de développement de l'insecte. Ainsi, le cuivre augmente le temps de développement larvaire et induit une plus faible émergence d'adulte chez la tordeuse de thé *Homona coffearia* (Sivipalan et Gnanapragasam, 1990). De même, le cuivre augmente le temps de développement larvaire, et conduit à un taux de mortalité plus élevé de 25% pour les larves et 40% pour les nymphes de *Trichoplusia ni* (Larsen et al., 1994). Dans le cas de *Diaprepes abbreviatus*, les effets délétères du cuivre n'ont été observé que sur les 4 premiers stades larvaires et pas sur les stades de développement plus tardifs (Lapointe et al., 2004). Il est possible que ces effets soient similaires sur le développement des larves de *S. titanus*, bien que nous ne l'ayons par constaté ; et ceci probablement parce que l'exposition des larves de *S. titanus* au cuivre circulant n'a jamais dépassé 24 h dans nos expérimentations. Il serait alors intéressant de vérifier l'effet exposition sur une plus longue durée et éventuellement des applications exogènes de cuivre sur les insectes au cours d'expérimentations ultérieures.

Toutefois, les études précédentes citées qui ont montré des effets délétères sur les insectes suite à une alimentation sur des boutures contaminées au cuivre, n'ont pas étudié si ce phénomène résultait d'un effet direct dû au cuivre circulant dans la plante ou était dû à des modifications induites dans la plante par un stress cuprique. Nos résultats permettent d'apporter des éléments de réponse puisque la répartition des larves sur les étages foliaires varie selon l'exposition au cuivre des boutures. Les vieilles feuilles soient moins fréquentées pour les boutures les plus contaminées alors que nous avons montré dans le chapitre 3 que la teneur en cuivre pour cet étage foliaire ne variait pas aux niveaux d'expositions testées. Il semble donc que ce soit plutôt des modifications induites dans la plante par le stress cuprique qui explique cette baisse de fréquentation des larves. Une baisse de fréquentation similaire est observée pour les jeunes feuilles F1 et F2 mais pas pour les jeunes feuilles F0, alors que la teneur en cuivre dans ces jeunes organes augmente pour l'exposition Cu 10 μ M, ce qui confirme l'hypothèse que l'augmentation de la teneur en cuivre circulant ne semble pas influencer le choix des larves. Par contre, nous avons montré que la teneur de cinq acides aminés augmentait dans les feuilles F0 et pas dans les feuilles F1 ce qui expliquerait que les feuilles F0 soient davantage fréquentées que les feuilles F1 pour les boutures les plus exposées au cuivre.

En effet, les insectes phytophages sont sensibles à la qualité nutritive des plantes puisqu'un changement de statut nutritif des plantes les affecte directement ou indirectement (Hartvigsen et al., 1995). C'est pourquoi les jeunes feuilles plus riches en azote et plus pauvres en métabolites secondaires de défense sont plus recherchées par les insectes car elles augmentent

la rapidité de développement des larves et des nymphes (Bastos et al., 2007, Bi et al., 2007), elles augmentent leur taille et celle des adultes et améliorent leur fécondité (Awmack et Leather, 2002). Ainsi, lorsqu'elles éclosent en début de saison, les larves recherchent davantage des feuilles de bonne qualité nutritive que lorsqu'elles éclosent en fin de saison lorsque les valeurs nutritives des feuilles sont plus homogènes (Kause et al., 1999). Chuche et al. (2014) avaient déjà montré des différences de teneur en acides aminés entre les jeunes feuilles, les feuilles plus âgées et les vieilles feuilles de vigne: les concentrations en isoleucine, en leucine et en phénylalanine, 3 acides aminés essentiels aux insectes sont ainsi plus élevées dans les jeunes feuilles puis diminuent au fur et à mesure de la maturation des feuilles. Par contre, la teneur en acides aminés non-essentiels augmentent dans les vieilles feuilles, notamment en alanine et en proline. De même la teneur en sucres dans les feuilles de vigne augmente avec leur maturité (Chuche et al., 2014). Contrairement à d'autres insectes, *S. titanus* semble toutefois peu sensible à la modification de la qualité de la ressource au cours du temps, leur vitesse de croissance étant non significativement affectée par la variation de qualité de sève phloémienne (Chuche et al., 2014). Il faut toutefois remarquer ici que Chuche et al. (2014) s'étaient surtout focalisés sur une vitesse de croissance, et donc sur des effets sur le long terme et non pas sur un choix alimentaire. Ces mêmes auteurs ont suggéré que les nombreux symbiotes présents dans la flore microbienne de *S. titanus* lui permettraient de pallier à la faible qualité nutritive des ressources en synthétisant les vitamines et les acides aminés essentiels à partir de l'aspartate et de la glutamine (Sasaki et Ishikawa, 1995, Crotti et al., 2010). Or, nous avons montré que les jeunes feuilles de vigne fortement contaminées en cuivre (Cu 10 μ M) ont des teneurs en glutamine plus élevées que celles des boutures témoins, ce qui pourrait expliquer qu'elles soient davantage fréquentées par les larves de cicadelles. De même, nous avons mesuré des teneurs des autres acides aminés essentiels aux insectes (Karley et al., 2002), qui sont similaires pour l'asparagine, l'isoleucine, la leucine la lysine, la méthionine, la thréonine et le tryptophane ou qui sont plus élevées pour la phénylalanine, la valine et l'histidine dans la sève des jeunes feuilles F0 des boutures les plus exposées au cuivre que celles des boutures témoins. Il est possible que ce soit l'augmentation de la concentration de ces 4 acides aminés essentiels ou la modification de leur concentration relative qui expliquent cette différence de comportement des larves de cicadelles. Il serait toutefois intéressant d'évaluer les effets du cuivre ingéré par *S. titanus* sur sa flore microbienne et plus particulièrement ses symbiotes.

Mais des différences de concentrations d'autres éléments dans les feuilles que nous n'avons pas mesurées pourraient également expliquer la différence de fréquentation des larves. Par exemple, une augmentation de la teneur en azote entraîne une diminution de la teneur en lignine ce qui est en général favorable à de nombreux insectes ravageurs (Salim et Saxena, 1991). Nous savons aussi qu'une contamination cuprique induit d'autres modifications métaboliques dans la plante que la perturbation de l'assimilation de l'azote, comme l'accumulation de composés oxydatifs tels que les peroxydes ou des composés phénoliques en inhibant l'activité des peroxydases, des catalases et des polyphénoloxidasés (Bastos et al., 2007). Or Larsson (1989) a montré que lorsque le stress végétal est suffisamment important, la diminution de la quantité ou de la qualité de la nourriture se traduit par la diminution de la performance des insectes piqueurs suceurs. De nombreuses études antérieures ont rapporté que les insectes ont répondu positivement à l'augmentation des éléments nutritifs mais négativement à l'augmentation des composés secondaires de défense comme les phénols, les tanins et les monoterpènes au sein de leurs plantes hôtes. Nous avons montré que les teneurs en acides aminés des feuilles F1 n'ont pas été modifiées avec l'exposition au cuivre, on peut donc supposer que c'est l'augmentation des composés secondaires de défense qui expliqueraient la baisse de fréquentation des larves sur ces étages foliaires ainsi que pour les

vieilles feuilles FZ. Cette hypothèse pourrait être confirmée en mesurant les concentrations de ces différents éléments de défenses des plantes dans les boutures de vignes en fonction de leur exposition au cuivre. Comme les jeunes organes sont souvent moins riches en composés secondaires de défense que les organes plus âgés, cela pourrait également expliquer que cet effet ne soit pas observé pour les feuilles F0.

De plus, Romeu-Moreno et Mas (1999) ont montré qu'un stress cuprique induisait une diminution du flux de sève ce qui peut être défavorable aux insectes piqueurs suceurs qui ont besoin d'un minimum de pression osmotique pour pouvoir prélever la sève. Or, les feuilles F0 des boutures contaminées sont plus riches en acides aminés intervenant dans la synthèse d'osmo-protecteurs, ce qui pourrait permettre le maintien du flux de sève dans les jeunes organes et expliquer le choix des larves. Des mesures sur les prélèvements de la sève par les larves à l'aide de la méthode d'électropénétrographie pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.

Enfin, le phytoplasme de la flavescence dorée (phytoplasme vecté exclusivement de vigne à vigne par *S. titanus*) ne semble pas sensible à la contamination cuprique de la vigne compte tenu de la progression de son aire de répartition et des fortes doses de cuivre dans les sols viticoles. Ce point n'a toutefois, à notre connaissance, jamais été étudié avec précision. Il serait intéressant d'étudier ce point, et en cas d'absence de relation de connaître les éventuels processus physiologiques qui lui permettent de s'y adapter.

4.2 Effets d'une exposition cuprique de la vigne sur le développement de *Plasmopara viticola*

Dans cette partie, nous cherchons à savoir si l'exposition au cuivre du sol des boutures de Cabernet Sauvignon et de Merlot est favorable ou non aux attaques de mildiou. Il est connu que le cuivre appliqué sur les feuilles est un fongicide efficace contre le mildiou. Mais qu'en est-il du cuivre absorbé dans le substrat et transloqué vers les feuilles ?

Pour cela, nous avons inoculé une souche de *P. viticola* sur des disques de feuilles provenant de boutures de vigne exposées préalablement à quatre concentrations différentes de cuivre. Nous avons suivi le développement du mycélium des colonies à la surface des disques foliaires puis nous avons mesuré l'intensité de sporulation de *P. viticola* huit jours après son inoculation.

4.2.1 Matériels et méthodes

Production et contamination des boutures de vigne

Le dispositif expérimental de l'exposition au cuivre des boutures de vigne est décrit dans le chapitre 3.

*Production d'inoculum de *P. viticola**

La souche *P. viticola* EAU08, issue du souchier du laboratoire de SAVE a été utilisée pour cette expérimentation. Elle a été repiquée à partir de 5 feuilles mères sur 25 feuilles F1 non vernissées de Cabernet Sauvignon sur la modalité témoin. Les feuilles filles provenant d'autres boutures témoins sont préalablement lavées à l'eau permutée puis séchées entre deux couches de papier absorbant. Leur pétiole est coupé au scalpel préalablement désinfecté à

l'éthanol à 70%. Chaque feuille est déposée à l'envers (face supérieure en dessous) dans une boîte de Pétri individuelle dont le fond est recouvert par un disque de papier stérile humidifié avec 3 ml d'eau stérile.

Les sporanges sont prélevés sur les feuilles mères à l'aide d'un pinceau stérile humidifié à l'eau stérile. Ils sont mis en suspension dans 0,5 litres d'eau stérile. La suspension est agitée au vortex puis placée dans un bac à glace de manière à éviter une ouverture prématurée des sporanges. A l'aide d'une pipette semi-automatique avec des cônes stériles à usage unique on dépose 20 gouttes de 15 µl de la suspension sur chaque feuille fille à proximité des nervures. La boîte de Pétri est ensuite scellée à l'aide de Parafilm puis placée en chambre de culture à $22 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une photopériode jour/nuit de 12h/12h. Tous les jours, la croissance du mycélium de *P. viticola* et l'absence de contamination par d'autres pathogènes sont contrôlés. Au bout de 7 jours, les feuilles les plus sporulantes sont sélectionnées comme source d'inoculum pour l'expérimentation.

Inoculation de P. viticola par flottaison des disques de feuilles de vigne

Des feuilles F2 (figure 71) sont prélevées sur des boutures de Cabernet Sauvignon et de Merlot préalablement exposées au cuivre (voir paragraphe précédent). Quatorze feuilles sont prélevées sur 14 plantes par modalité et par cépage. Les feuilles sont lavées individuellement à l'eau permutée puis séchées entre deux couches de papier absorbant. Trois disques par feuille sont réalisés à l'aide d'un emporte pièce de 18 mm de diamètre, préalablement désinfecté à l'éthanol à 70%.

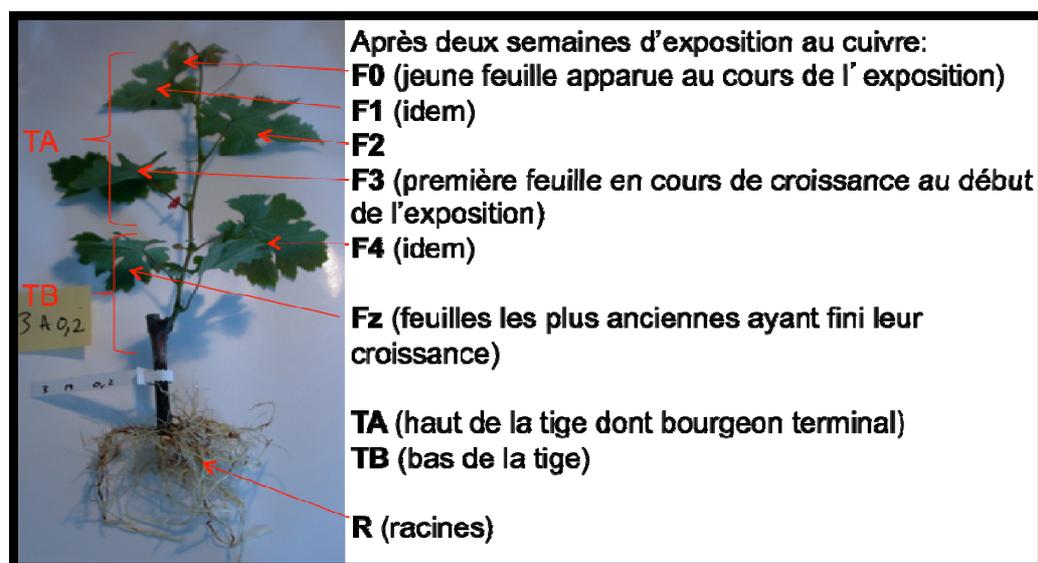


Figure 71: rappel de la répartition des étages foliaires selon notre protocole

Les sporanges de *P. viticola* EAU08 sont prélevés à l'aide d'un pinceau stérile humide sur les feuilles sélectionnées comme source d'inoculum (voir paragraphe ci-dessus) puis sont mises en suspension dans 3 ml d'eau stérile dans un tube Falcon, préalablement placé dans de la glace. La mesure de la concentration en sporanges de la solution est réalisée à l'aide d'une cellule de Malassez. La solution est diluée de manière à obtenir 1100 ml de solution finale à 5000 sporanges/ml. La solution finale est stockée dans une bouteille en verre stérile placée dans la glace. Huit ml de cette solution sont versés dans chacune des 128 petites boîtes de Pétri de 54 mm de diamètre. Trois disques de la même feuille sont mis à flotter dans la même boîte de Pétri, face inférieure en contact avec la solution, pendant 4 heures.

Dans des boîtes de Pétri carrées de 12 cm de côté, un carré de papier filtre stérile est humidifié avec 7 ml d'eau stérile. Les 3 disques de la même feuille après avoir été inoculés par flottaison sont alignés dans la boîte à l'aide d'une pince stérilisée, face supérieure du disque contre le papier. Dans chaque boîte carrée, des disques de feuilles de chacune des 4 modalités de cuivre sont placées soigneusement pour limiter l'effet boîte et les problèmes de contamination accidentelle (figure 72). Des boîtes distinctes sont utilisées pour chaque cépage. Pour chaque modalité de cuivre et pour chaque cépage, on dispose donc de 42 disques soit 42 répétitions. Les 28 boîtes sont scellées avec du Parafilm® puis placées dans une enceinte climatique programmée (Conviron®) maintenue à $16 \pm 1^\circ\text{C}$ avec 70% d'humidité relative et une alternance jour/nuit de 16/8 heures. Ces conditions suboptimales permettent de suivre plus précisément la croissance des colonies. L'emplacement des boîtes est modifié tous les jours de manière à éviter un effet non intentionnel d'exposition différente à la lumière et à la ventilation du Conviron®.

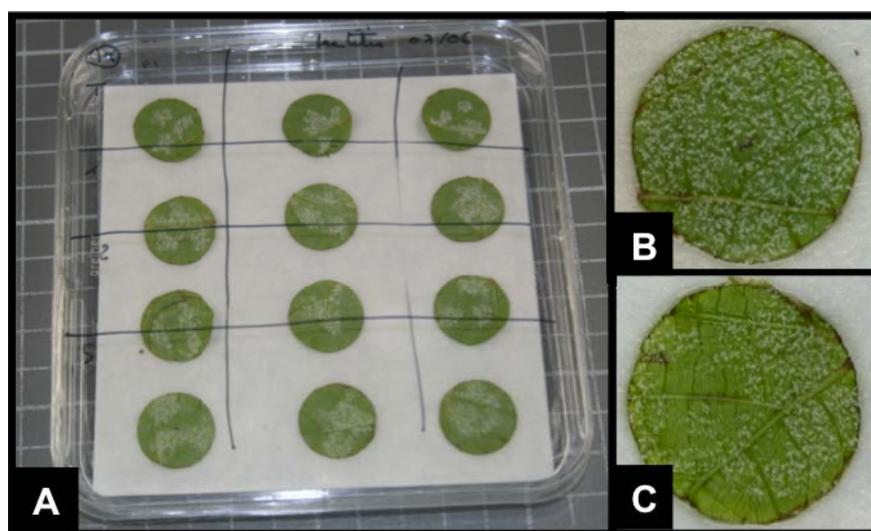


Figure 72: Boîte de Pétri contenant des disques de feuilles de plantes contaminées au cuivre (A), exemple de disque colonisés par *P. viticola* pour la modalité Cu 0,2 μM (B) et pour la modalité Cu 10 μM (C) colonisés par *P. viticola*

*Suivi de la croissance de *P. viticola**

Le suivi est effectué quotidiennement par observation à la loupe binoculaire pendant 8 jours. On évalue le pourcentage de recouvrement de la surface du disque colonisé par le pathogène tout en s'assurant qu'il n'y a pas de contamination des disques par d'autres pathogènes. Les disques sont ensuite congelés à -80°C afin de pouvoir les analyser ultérieurement au compteur à particules pour mesurer l'intensité de sporulation.

*Mesure de l'intensité de sporulation de *P. viticola* à l'aide d'un compteur à particules*

La sporulation finale est mesurée pour chaque disque de feuille à l'aide d'un compteur à particules Beckman Coulter counter® Multisizer™ III. Les disques de feuilles ont été préalablement décongelés à température ambiante. Chaque disque de feuille est placé dans une cuve contenant 15 ml d'Isoton® et une goutte de dispersant, face inférieure en contact avec le liquide. Après agitation de la cuve permettant la mise en suspension des sporanges, le disque de feuille est enlevé de la solution obtenue. La cuve est introduite dans le compteur et le comptage est réalisé automatiquement à l'aide de 3 prises d'essai par un électrolyte de 500

µl par échantillon. Le diamètre des particules sélectionnées pour le comptage des spores de mildiou est compris entre 8 et 20 µm.

Analyses statistiques

La méthode d'aire sous la courbe AUDPC (Area Under the Disease Progress Curve) est utilisée pour comparer les croissances des surfaces de disques colonisées. La formule utilisée

$$AUDPC = \sum_i^{n-1} \left[\left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i) \right]$$

est :

Avec y la surface de disque colonisée le jour i , et t_i le jour i .

Les analyses statistiques sur la croissance des colonies à partir des valeurs d'AUDPC et celles sur l'intensité de sporulation sont réalisées à l'aide du logiciel R version 1.65. Les tests de Shapiro-Wilk et Levène, est utilisé pour tester la normalité des données et l'homogénéité des variances, ont montré que les données ne suivaient pas une loi normale. Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est donc utilisé pour traiter les données. Les comparaisons des moyennes entre modalités sont réalisées à l'aide du test post-hoc de Wilcoxon.

4.2.2 Résultats

4.2.2.1 Effet d'une exposition cuprique des boutures de Cabernet Sauvignon et de Merlot sur la croissance des colonies de *P. viticola*

La croissance des colonies de *P. viticola* dépend très fortement du cépage mais aussi de l'exposition au cuivre des boutures (figure 73). La croissance des colonies est significativement plus élevée sur des disques de feuilles de Cabernet Sauvignon que de Merlot ($P < 10^{-15}$). Quelque soit le cépage, la croissance des colonies est la plus importante lorsque les boutures sont exposées à Cu 1 µM.

La croissance des colonies sur le Cabernet Sauvignon est significativement plus importante sur des boutures exposées à Cu 1 µM et Cu 10 µM que sur des boutures témoins (Cu 0,2 µM) ou exposées à Cu 2,5 µM ($P < 0,05$).

La croissance des colonies est plus importante sur le Merlot pour les boutures exposées à Cu 1 µM que sur les boutures témoins (Cu 0,2 µM) ou exposées à Cu 10 µM ($p < 0,01$). Dans le cas du Merlot, on a donc une courbe de réaction dose-réponse, avec un maximum de croissance des colonies pour des boutures exposées à 1 µM.

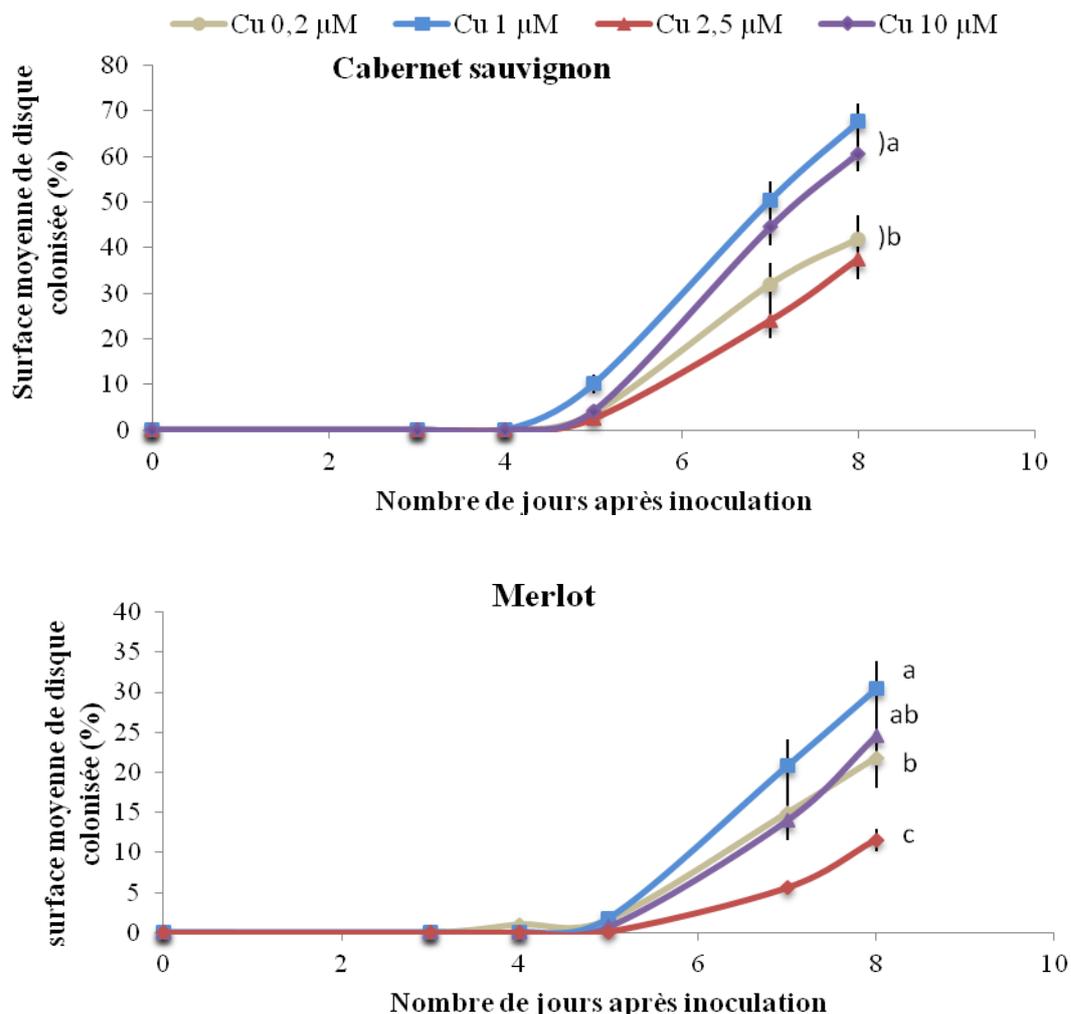


Figure 73: Evolution dans le temps du taux de recouvrement de disques de feuille par *P. viticola* en fonction du cépage et du niveau d'exposition au cuivre de la vigne (moyenne \pm erreur standard)

4.2.2.2 Effets d'une exposition au cuivre des deux cépages sur l'intensité de sporulation de *P. viticola*

L'intensité de sporulation dépend surtout du cépage sur lequel s'est installé *P. viticola* ($p < 10^{-15}$). L'intensité de sporulation sur des disques de feuilles de Cabernet Sauvignon est au moins deux fois plus élevée que sur les disques de feuilles de Merlot (figure 74).

L'intensité de sporulation sur les disques de feuilles de Cabernet Sauvignon est plus importante pour les boutures exposées au cuivre à Cu 1 μM que pour les témoins ($p = 0,0028$) ou celles exposées à Cu 2,5 μM ($p = 0,0012$). L'intensité de sporulation sur des feuilles de boutures exposées à Cu 10 μM sont également plus élevées que celles exposées à Cu 2,5 μM ($p = 0,0157$).

Sur les disques de feuilles de Merlot, l'intensité de sporulation est significativement plus élevée pour les boutures exposées à Cu 1 μM que celles exposées à Cu 10 μM ($p = 0,0028$).

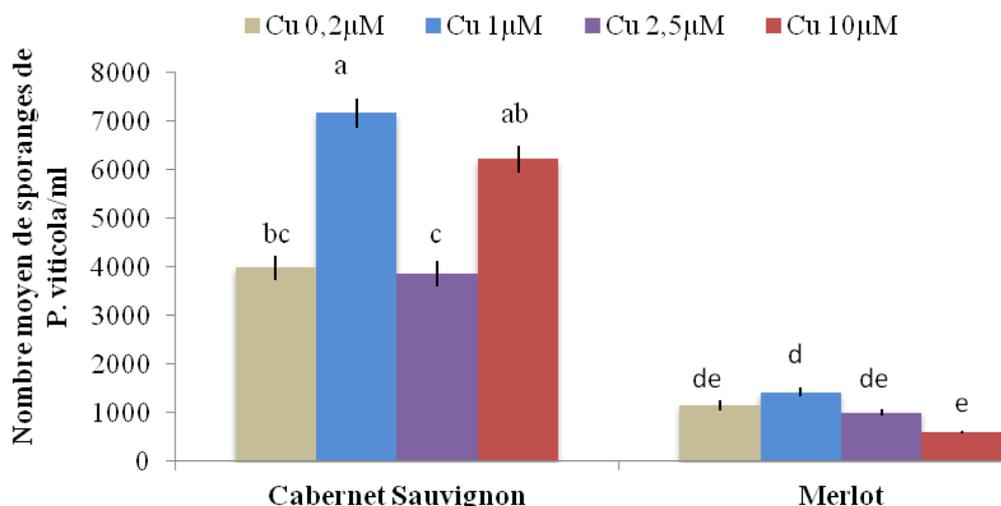


Figure 74: Nombre moyen de sporanges de *P. viticola* huit jours après l'inoculation en fonction du cépage et du niveau de contamination cuprique du substrat (moyenne \pm erreur standard)

4.2.3 Discussion

Les cépages de *Vitis vinifera* sont considérés comme très sensibles au mildiou comparés à d'autres espèces de *Vitis* comme *V. riparia*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. rupestris* ou *V. berlandieri* (Gessler et al., 2011). Nos résultats montrent que les deux cépages de *Vitis vinifera* que nous avons testé, le Merlot et le Cabernet Sauvignon sont effectivement sensibles à cette maladie qui s'y développe aisément (Galet P., 1977). Mais contrairement à Galet (1977), nos résultats montrent que le Merlot est moins sensible que le Cabernet Sauvignon à la maladie, puisque le pathogène se développe significativement moins sur le Merlot que sur le Cabernet Sauvignon. Des différences de structures ou de métabolisme existent entre les cultivars qui pourraient expliquer la différence de sensibilité des cépages. Ce sont par exemple la densité des stomates (Rogiers et al., 2011), la rapidité de réponse des défenses naturelles lors du contact avec le pathogène (Dai et al., 1995), la composition des métabolites de défenses secondaires, l'épaisseur ou la composition des parois cellulaires, ou de la différence de qualité des ressources nutritives stockées dans les cellules du mésophylle.

Quel que soit le cépage, la croissance des colonies sur disques de feuilles est meilleure pour une exposition au cuivre à 1 μ M des boutures de vigne. Lorsque l'exposition au cuivre des boutures augmente, la croissance du mycélium est ralentie et que la dynamique de sporulation diminue. Un développement plus lent du mycélium et une diminution du taux de sporulation de *P. viticola* ont déjà été observés sur des cépages moins sensibles (Pezet et al., 2004). Ces phénomènes résultent d'une meilleure efficacité du système de la plante qui se traduit habituellement d'abord par la production de composés réactifs de l'oxygène dans les stomates infectés par le pathogène (Allègre et al., 2009, Kortekamp et Zyprian, 2003) suivies par la fermeture des stomates (Allègre et al., 2009) et la production de callose autour des zoospores (Gindro et al., 2003); Puis, dans un second temps, les réactions de défenses mises en œuvre sont une augmentation de la lignification des cellules situées à proximité de la zone d'infection (Dai et al., 1995, Hamiduzzaman et al., 2005). Ces réactions de défenses se traduisent aussi par une augmentation de la teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques dans les stomates et les cellules avoisinantes qui bloquent la pénétration du pathogène vers les cellules du mésophylle (Dai et al., 1995, Kortekamp et Zyprian 2003) et enfin par la synthèse de phytoalexines à base de stilbènes (resvératrol et ses homologues comme la viniférine) dans les tissus nécrosés responsable d'une forte diminution de la sporulation du pathogène (Dai et

al., 1995, Pezet et al., 2004). Les cépages sensibles comme le Cabernet Sauvignon induisent aussi ce type de réaction en présence du pathogène mais plus faiblement et moins rapidement ce qui explique sa sensibilité à *P. viticola* (Gessler et al., 2011). Or, un stress abiotique comme un stress cuprique subit par une plante, entraîne des réactions de défenses similaires non spécifiques comme un stress oxydant qui se traduit par la production de composés réactifs de l'oxygène (Hall, 2002, Yruela, 2005, Puig et al., 2007). Un stress cuprique induit aussi la production de métallothionéines et de phytochélatines (Clemens, 2001), la production de composés phénoliques (Rossini et al., 2009), l'accumulation de cuivre dans l'épiderme des feuilles (Rossini et al., 2009), la synthèse de la lignine des parois cellulaires (Marschner, 1995, Clemens, 2001) et la perturbation de la photosynthèse et de la conductance stomatique (Romeu-Moreno et Mas, 1999). Il est possible que le stress cuprique subit par les boutures de vignes à partir d'une exposition à Cu 2,5 μM engendre les premières réactions de défense de la plante, qui sont donc déjà activées avant l'inoculation du pathogène, ce qui pourrait expliquer la diminution du taux de sporulation et le ralentissement du développement de *P. viticola* sur les boutures contaminées. De plus, la diminution du flux de sève et de la photosynthèse suite à un stress cuprique (Romeu-Moreno et Mas, 1999) pourrait conduire à une fermeture plus fréquente ou plus longue des stomates, ce qui limiterait l'installation du pathogène sur la plante. Nos résultats montrent que l'exposition au cuivre à 10 μM permet de freiner davantage encore le développement et la sporulation de *P. viticola* sur le Merlot.

Par contre, nous observons un effet contraire pour le Cabernet Sauvignon : l'exposition à 10 μM des boutures semble plus favorable à *P. viticola* qu'une exposition des boutures à 2,5 μM . Or, nous avons montré dans le chapitre 3 que le Cabernet Sauvignon commençait à présenter des symptômes de toxicité cuprique à cette forte concentration (diminution de la croissance foliaire, modification de la composition en acides aminés) contrairement au Merlot qui semble plus tolérant au cuivre. Il est possible que les premiers effets délétères du cuivre sur le Cabernet Sauvignon perturbent suffisamment le métabolisme de la plante notamment en inhibant certaines réactions enzymatiques, pour engendrer des conditions plus favorables à *P. viticola*. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par exemple en mesurant l'expression des gènes ou l'activité des enzymes impliquées dans les réactions spécifiques de défense au pathogène ainsi que l'activité des stomates pour différentes expositions au cuivre de boutures de Cabernet Sauvignon.

4.3 Effets de l'exposition au cuivre de la vigne sur les maladies de dépérissement dues aux *Botryosphaeria sp.* : étude du cas de *Neofusicoccum parvum*

Dans cette partie, nous cherchons à savoir si l'exposition au cuivre des boutures greffées de Cabernet Sauvignon, est favorable au développement des maladies de dépérissement dues à *Botriosphaeria sp.* Ces dépérissements étant provoqués par différents pathogènes fongiques, nous avons sélectionné l'un d'entre eux, *Neofusicoccum parvum*, un champignon endophyte de la vigne pouvant devenir l'un des agents pathogènes les plus virulents impliqués dans cette maladie. Nous avons inoculé *N. parvum* à des plants greffés préalablement repotés dans trois sols ayant des teneurs en cuivre disponible différentes. Cinq mois après l'inoculation nous avons mesuré la taille des nécroses provoquées par *N. parvum*. Nous avons également réalisé une analyse des communautés microbiennes, bactéries et champignons, par empreinte moléculaire SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) dans les différents organes de la vigne afin d'évaluer les éventuels effets dus à l'exposition au cuivre des boutures.

4.3.1 Matériels et méthodes

Il s'agit d'une expérimentation réalisée en conditions semi-contrôlées sur des plants greffés de Cabernet Sauvignon rempotés dans de la terre sous tunnel ouvert.

Sélection des sols viticoles

Suite aux résultats des analyses de sols réalisées dans le chapitre 2, trois parcelles ont été sélectionnées afin de constituer un gradient de contamination en cuivre de la solution du sol (tableau 15). Nous avons ainsi choisi une parcelle à faible teneur en cuivre, proche du fond pédogéochimique, récemment plantée en vigne (P16), et deux parcelles viticoles de longue date, de concentration totale en cuivre et de pH variable, mais présentant un extrême soit pour la teneur totale dans le sol ou la concentration mesurée par DGT (P33), soit pour la concentration dans la solution du sol (P8).

Tableau 15: Caractéristiques physico-chimiques des 3 parcelles viticoles retenues pour l'expérimentation

parcelle	pH	Cu teneur totale (mg/kg)	Cu extraction EDTA (mg/kg)	Cu solution du sol (µg/l)	Cu DGT (µg/l)	MO (%)	CEC (cmol ⁺ /kg)	CaCO ₃ (g/kg)	Argiles (%)
P16	7,7	3,1	2,6	33,2	2,6	1,4	3,96	<1	4,9
P8	5,6	107,9	76,72	436,7	48,0	1,4	2,16	<1	4,6
P33	7,8	324,7	219,2	73,6	134,4	2,4	4,29	<1	5,1

400 kg de terre ont été prélevés sur les 10 premiers cm de chaque parcelle dans l'inter-rang en avril 2013.

Production d'inoculum de N. parvum

L'agent pathogène impliqué dans les maladies de dépérissements dues à *Botryosphaeria sp.* choisi est la souche COU02 de *Neofusicoccum parvum*, appartenant aux *Botryosphaeria sp.* Etant très virulent, il dégrade rapidement le bois, se traduisant par l'apparition de nécroses importantes 4-5 mois après inoculation. Cette souche a été prélevée en 2008 sur une parcelle de Cabernet Sauvignon de Couhins, située en appellation Pessac-Léognan en Gironde.

Matériel végétal

Des clones certifiés sains (CleanPLANTS) de Cabernet Sauvignon cl 337 greffés sur 101.14 cl 3, âgés de 2 ans, certifiés, sont rempotés dans des pots contenant 8 kg de terre puis placés sous tunnel à raison de 42 plants par type de sol ont été rempotés. Ils sont arrosés par des goutteurs deux fois par jour et un apport de solution nutritive est effectué une fois par semaine. Ils sont répartis sur 4 rangs contenant chacun 10 pots de chaque modalité, l'un des rangs contient 2 pots supplémentaires d'une modalité. Chaque plant est identifié individuellement.

Inoculation de Neofusicoccum parvum

L'inoculation de *N. parvum* est effectuée deux mois après le rempotage, au stade 4 feuilles afin de s'assurer d'une bonne reprise des plants. A l'aide d'une perceuse, un trou de 4 mm de diamètre est effectué environ 2 cm sous le bourrelet de greffe. Dans ce trou, on introduit un disque de culture fongique prélevé en bordure du mycélium de champignon, dans les boîtes de Petri. On referme le trou avec de la paraffine légèrement chauffée. Afin de tester l'effet du

perçage, deux types de témoins ont été prévu pour chaque modalité de cuivre : ceux sans trou et ceux avec trou mais sans inoculation.

Pour chaque modalité on a donc :

- 30 plants inoculés avec *N. parvum*
- 6 plants témoins avec trou
- 6 plants témoins sans trou

L'apparition de nécroses au niveau du cep, caractéristiques de la maladie, nécessite plusieurs mois d'incubation. Au cours de l'été, les plants sont palissés puis écimés. L'apport de solution nutritive est arrêté début septembre lorsque la croissance des plants commence à ralentir. Les plants sont arrosés manuellement 1 fois par quinzaine jusqu'à leurs prélèvements 5 mois plus tard. Seule la moitié des plants est prélevée pour cette expérimentation.

Dosage du cuivre dans les pots

On mesure la biodisponibilité du cuivre dans les pots à la fin de l'expérimentation. Les teneurs totales en cuivre des sols sont déjà connues en début d'expérimentation. Il s'agit seulement de mesurer la biodisponibilité du cuivre à l'aide de 15 capteurs passifs DGT qu'on laisse 48 h en place dans les pots à proximité des racines. Le dispositif DGT est décrit dans le chapitre 2 page 81. 5 DGT par dose de cuivre sont déposées dans 5 pots différents : 2 dans des pots de plants témoins et 3 dans des pots de plants inoculés. La température du sol dans les pots est mesurée tous les quarts d'heure pendant les 48h à l'aide d'une station d'acquisition météorologique Campbell.

*Mesures des nécroses provoquées par *N. parvum**

Les plantes ont été dépotées au préalable. Sur chaque plante prélevée, la longueur du tronc (distance entre les premières racines et les premiers rameaux) et la distance entre le trou d'inoculation et le haut des rameaux sont mesurés. Le matériel utilisé par la suite est désinfecté à l'éthanol à 70 % avant chaque utilisation. Les tiges des rameaux et les racines sont séparées du tronc à l'aide d'un sécateur. Le tronc est coupé longitudinalement à l'aide d'un massicot. La largeur de la nécrose, la longueur totale de la nécrose ainsi que la longueur entre le trou d'inoculation et l'extrémité de la nécrose située en dessous de ce trou sont mesurées (figure 75).



Figure 75: Coupe longitudinale du cep de vigne témoin sans trou (A), témoin avec trou (B) et 5 mois après l'inoculation de *N. parvum* (C).

Prélèvement et préparation des échantillons végétaux

Les plantes sont regroupées au hasard par trois afin d'avoir suffisamment de matière pour extraire l'ADN des différentes parties du tronc, des racines et des tiges. On constitue donc des pools pour chaque modalité :

- 6 pools de 2 plantes inoculées
- 3 pools de 2 plantes témoins sans trou
- 3 pools de 2 plantes témoins avec trou.

On a donc 12 pools par modalité soit un total de 36 pools différents.

Les plantes sont écorcées préalablement avec un couteau de manière à n'avoir que des communautés endophytes et ainsi exclure d'éventuelles exophytes de la vigne. Les prélèvements sont effectués en zone stérile à l'aide d'un sécateur.

Sur chaque plant, on prélève 4 échantillons distincts :

- 1 tronçon de 2 cm du tronc au niveau du trou d'inoculation, avec un maximum de tissus nécrosés du porte-greffe
- 1 tronçon de 2 cm au bas du tronc dans une zone de tissus sains du porte-greffe
- 2 tronçons de 2 cm au niveau des tiges du cépage
- environ 20 grammes de racines

A l'aide d'une pince métallique désinfectée au préalable, chaque tronçon est plongé dans un bécher contenant de l'eau distillée stérile, séché à l'aide de papier filtre stérile puis redécoupé en lamelles fines avec un sécateur stérile. Les racines sont d'abord rincées dans un bac d'eau permutée puis rincées à l'eau distillée stérile en zone stérile et enfin séchées au papier filtre stérile. Les échantillons sont ensuite stockés au congélateur à -20°C.

Le broyage des troncs, des tiges et des racines est réalisé dans un broyeur à bille (TissueLyserII, Qiagen) en présence d'azote liquide afin d'éviter la dégradation de l'ADN. La poudre obtenue est versée dans de nouveaux tubes de 15 ml stockés à -20°C. Elle servira en partie pour l'extraction d'ADN et en partie pour le dosage du cuivre au spectromètre d'absorption atomique.

Extraction d'ADN du matériel végétal et analyses SSCP

Soixante mg de poudre de chacun des 144 échantillons sont prélevés pour en extraire l'ADN à l'aide du kit Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Les extraits d'ADN sont ensuite quantifiés par un NanoDrop (ND-1000, ThermoScientific, Labtech) et homogénéisés à une concentration de 10 ng/μl.

L'ADN est amplifié par PCR dans un thermocycleur Mastercycler Eppgradient (Eppendorf) dans un mélange réactionnel (volume final de 25 μl) composé de 1 μl d'ADN à 10 ng/μl, 1 μl de dNTP à 10 mM, 2,5 μl de Bovine Serum Albumine (BSA, New England BioLabs) à 10 μg/μl, 0,5 μl de chaque amorce à 20 μM, 2,5 μl de tampon Pfu (10x), 1,25 unité de Pfu Turbo (Agilent Technologies) et 16,5 μl d'eau distillée stérile. Les amplifications ont été réalisées à l'aide de la Pfu Turbo puisque cette Taq polymérase génère des fragments d'ADN à bouts francs et possède un taux d'erreurs faible (1.6×10^{-6} erreurs/base). De la BSA (Serum Albumine Bovine) a été incorporée aux mélanges réactionnels afin de supprimer l'action des inhibiteurs de PCR tels que les polysaccharides et les composés phénoliques extraits de la plante en même temps que les ADN.

La technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) a été initialement développée pour la détection du polymorphisme ou de mutations ponctuelles de l'ADN, puis

elle a été adaptée à l'étude des communautés microbiennes. Cette technique est basée sur la séparation d'ADN simples brins ayant adopté une conformation tridimensionnelle particulière en conditions non dénaturantes, ce repliement étant dépendant de la séquence nucléotidique et de l'environnement physico-chimique (température et force ionique). Les différentes conformations vont générer des comportements migratoires et des mobilités différentes, rendant possible la séparation de mélanges complexes de populations. La structure secondaire permettra de distinguer des produits appartenant à des phylotypes différents même s'ils possèdent le même poids moléculaire. Elle permet également de séparer des produits PCR ayant une longueur similaire mais ayant des séquences nucléotidiques différentes.

Pour les champignons, la paire d'amorces marquées ML1-ML2 qui reconnaît la grande sous-unité mitochondriale de l'ADNr est utilisée. Dans ce cas, les paramètres de cycles de PCR sont de 95°C pendant 2 min suivie de 35 cycles à 95°C pendant 30 secondes, 58°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 min et l'extension finale à 72°C pendant 10 min. Les produits de PCR (environ 250 pb) sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) avant l'analyse SSCP.

Pour les bactéries, les amorces 799f et 1115r marquée qui reconnaissent 16S de l'ADNr nucléaire sont utilisées. Dans ce cas, les paramètres de cycles de PCR sont de 95°C pendant 2 min suivie de 25 cycles à 95°C pendant 45 secondes, 54°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 1 min et l'extension finale à 72°C pendant 10 min. Les produits de PCR (environ 350 pb) sont également visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) avant l'analyse SSCP.

Les Analyses SSCP sont réalisées avec un séquenceur automatique ABI PRISM 3130 (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystem) équipé de quatre capillaires de 36 cm. 1 µl de produit PCR est mélangé avec 18,8 µl de formamide déionisé (Applied Biosystems) et 0,2 µl d'étalon interne (marqueur de taille GeneScan-400 ROX, Applied Biosystem). Le mélange de l'échantillon est dénaturé à 95°C pendant 5 min et refroidi immédiatement dans de la glace pendant 10 min avant d'être chargé dans l'appareil. Le polymère non dénaturant se compose de 5,6% de POP Conformational Analysis Polymer (Applied Biosystem), 10 % de glycérol, de tampon EDTA (10x, Applied Biosystems) et d'eau. Le temps de migration est fixé à 2000 secondes, la tension à 15 kV et la température à 32°C. Les échantillons vont co-migrer avec le marqueur de taille interne (GeneScan -400 ROX) qui permettra l'alignement et la comparaison des profils obtenus pour chaque échantillon.

Dosage du cuivre dans les échantillons végétaux

Pour chaque échantillon, 2,5 grammes de poudre végétale est mis à prédigérer pendant 24 heures dans 2,5 ml d'acide nitrique à 70 % et 3 ml de H₂O₂. La minéralisation au bain marie puis le dosage au spectromètre d'absorption atomique ont été réalisés selon le protocole décrit dans le chapitre 3 page 107.

Analyses statistiques

Les résultats sur les teneurs en cuivre dans les pots, dans la vigne et la longueur des nécroses sont analysés à l'aide du logiciel R version 1.65. Les tests de Shapiro-Wilk et Levène, utilisés pour tester la normalité et l'homogénéité des variances, montrent que les données concernant les teneurs en cuivre dans les pots et dans les racines ne suivent pas une loi normale. Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis est donc utilisé pour traiter ces données. La comparaison des médianes des teneurs en cuivre des sols dans les pots puis des racines en fonction des sols est réalisée à l'aide du test post-hoc de Wilcoxon. Les données sur les teneurs en cuivre des

parties aériennes de la vigne (tige, cep, nécroses) ainsi que celles sur la longueur des nécroses suivent une loi normale, elles sont traitées à l'aide d'une analyse de variance puis sont comparées post-hoc à l'aide du test de Tukey.

Les différentes empreintes moléculaires SSCP des communautés bactériennes ou fongiques sont alignées à l'aide du package StatFingerprints version 2.0 sous R version 1.65. Ils sont ensuite comparés et analysés par une ACP (Analyse en Composantes Principales) grâce au package Rcmdr version 2.0-4. Les ellipses obtenues représentent les intervalles de confiance à 95% des échantillons centrés sur leur barycentre.

4.3.2 Résultats

4.3.2.1 Teneur en cuivre dans le sol

Comme prévu, il existe de fortes disparités de la teneur en cuivre disponible entre les trois sols testés. La teneur en cuivre disponible mesurée par le système DGT dans les pots est en moyenne de 766 $\mu\text{g/l}$ pour le sol P33, 396 $\mu\text{g/l}$ pour le P8 et de 47 $\mu\text{g/l}$ pour le P16. Le sol P16 a une teneur en cuivre disponible significativement plus faible que les deux autres ($P=0,024$). Par contre, les valeurs sont beaucoup plus élevées que les mesures faites sur sol (tableau 15) d'un facteur 18 pour le sol P16, 8 pour le sol P8 et 6 pour le sol P33. La variabilité est également beaucoup plus importante, témoignant d'une forte variation de biodisponibilité du cuivre suivant les pots de culture. Il est donc probable que la biodisponibilité ait varié au cours de la culture. On peut donc s'attendre cependant à ce que les concentrations mesurées dans le végétal soient plus élevées que celles attendues.

4.3.2.2 Teneur en cuivre dans la vigne

Dans cette expérimentation, les teneurs en cuivre dans les parties aériennes ont été nettement moins élevées que dans les racines (figure 76) conformément à ce qui a été démontré dans le chapitre 3. Les concentrations en cuivre dans les racines sont significativement différentes en fonction du sol viticole ($P < 10^{-4}$). Plus la teneur en cuivre disponible du sol est élevée ($P33 > P8 > P16$) plus la teneur en cuivre dans les racines augmente. Les concentrations mesurées sont cohérentes avec les résultats obtenus dans le chapitre 3. En effet, la concentration mesurée dans la solution du sol P16 correspond à une exposition à 0,5 μM . Or les concentrations des racines pour le porte-greffe 101.14 mesurées en sol sont bien du même ordre que celles mesurées dans la l'expérimentation sur perlite, pour une exposition entre 0,2 et 1 μM . Nous constatons la même chose pour le sol le plus contaminé (P8), qui correspondrait à une exposition de 7 μM et pour lequel les concentrations mesurées dans les racines sont intermédiaires entre la modalité 2,5 μM et la modalité 10 μM . La différence pour le sol P33 est liée à une sous-estimation de la biodisponibilité par la mesure seule de la concentration en solution, comme le montre la mesure DGT. Nous vérifions ainsi que notre gamme de contamination, choisie *a priori* à partir des résultats du chapitre 2 et du chapitre 3, a bien conduit à des expositions au cuivre différentes.

Les teneurs en cuivre dans les ceps ne sont pas différentes en fonction du sol viticole, par contre elles varient en fonction de la localisation du prélèvement ou de l'organe ($P < 10^{-6}$). Ainsi, les teneurs en cuivre dans le bas du cep du porte-greffe ($3,8 \pm 1,3 \text{ mg/kg}$) sont plus faibles que dans la tige du greffon ($7,0 \pm 3,3 \text{ mg/kg}$), tandis que la zone de nécrose située entre les deux, présente des teneurs en cuivre intermédiaires ($5,4 \pm 1,7 \text{ mg/kg}$). Pour chaque type de sol, la teneur en cuivre dans la tige du greffon est significativement plus élevée que

dans le cep du porte-greffe ($P < 0,05$) ce qui semble indiquer que la translocation est plus importante vers le greffon. Les concentrations mesurées dans la tige de cette expérimentation sont plus élevées que dans la tige des boutures de Cabernet Sauvignon cultivées sur substrat perlite pour des expositions comprises entre 0,2 et 2,5 μM mais plus faible que celle mesurée pour une exposition de cuivre à 10 μM . La différence pourrait être liée au fait que dans cette expérimentation nous ne travaillons pas sur des boutures franches mais sur des plants greffés dans cette expérimentation. Cette observation suggère aussi que l'exposition au cuivre des boutures greffées n'a pas dépassé 10 μM .

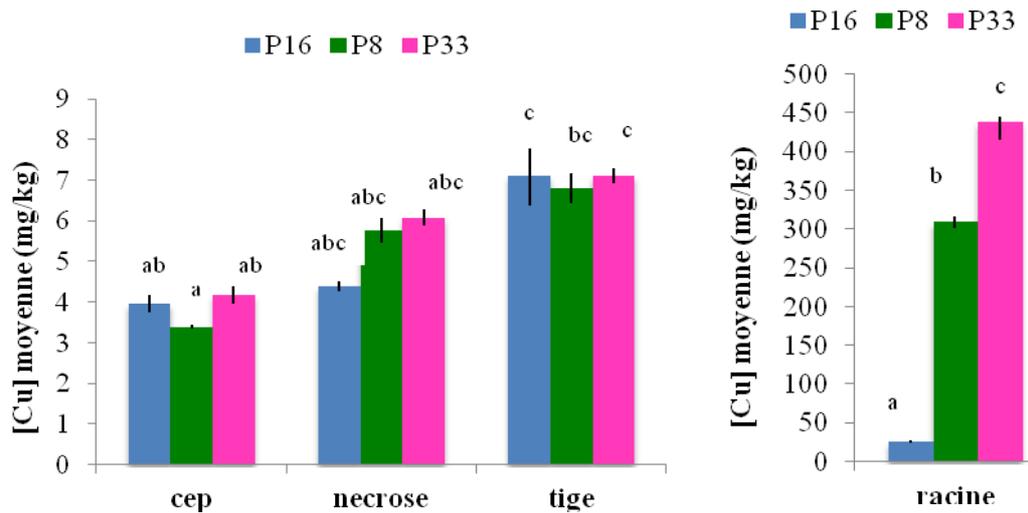


Figure 76: Concentration moyenne en cuivre du cep, de la zone nécrosée, de la tige et des racines de plants greffés de vigne en fonction des sols viticoles P33, P14 et P8 avec teneur en cuivre de $P33 > P8 > P16$ (moyenne \pm erreur standard). Les barres créditées de lettres identiques ne sont pas différentes ($P > 0,05$)

Nous n'avons pas trouvé de différence significative des teneurs en cuivre entre un plant témoin et un plant inoculé par *N. parvum*. Le pathogène n'induit pas, dans nos conditions expérimentales, de modification de la concentration en cuivre dans la vigne.

4.3.2.3 Effets d'une exposition au cuivre de la vigne sur la taille des nécroses produites par *N. parvum*

Les plantes témoins non percées ne présentent pas de nécroses alors que plantes témoins avec trou (mais non inoculées) présentent des petites nécroses de 0,5 à 0,8 \pm 0,8 cm situées à proximité du trou, vraisemblablement induites par le perçage (figure 77). Il n'y a pas eu de différence significative de taille des nécroses entre les témoins ayant poussé sur des sols différents. Les petites nécroses induites par le perçage, ne résultent donc pas d'une différence de qualité du sol en tant que ressource nutritive de la plante.

Les plants inoculés par *N. parvum* ont des nécroses significativement plus importantes que les plants témoins ($P < 0,001$). C'est donc bien *N. parvum* qui est responsable de ces nécroses. Cinq mois après l'inoculation, les nécroses atteignent 3,1 \pm 1,1 cm et 3,6 \pm 1,2 cm pour les plants inoculés ayant poussé dans le sol P16 et P8 respectivement. Les plants inoculés ayant poussé sur le sol P33, le plus contaminé en cuivre, présentent des longueurs de nécroses importantes de 8,1 \pm 2,1 cm, significativement plus importantes ($p < 0,001$).

Aucune différence significative de la largeur des nécroses, de l'ordre de 2-3 mm en moyenne, n'a été mise en évidence sur nos échantillons. Nous n'avons pas trouvé de chancre cinq mois après l'inoculation de *Botryosphaeria* sp. Les nécroses qui progressent davantage vers le bas que vers le haut des boutures, n'ont jamais franchi la soudure de greffe.

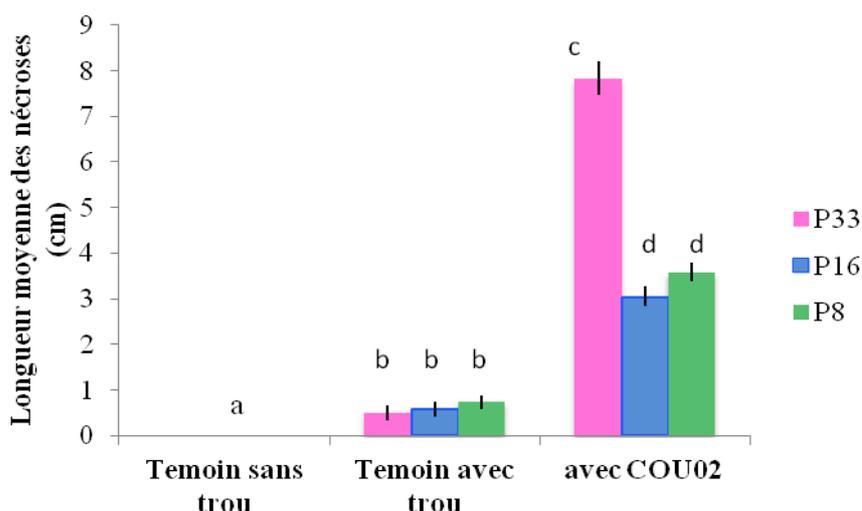


Figure 77: Longueur des nécroses occasionnées par la souche COU02 de *N. parvum* sur des ceps de Cabernet Sauvignon en fonction du type de sol (moyenne \pm erreur standard). Les barres créditées de lettres identiques ne sont pas différentes ($P < .05$).

4.3.2.4 Effets d'une exposition au cuivre sur les communautés fongiques endophytes de la vigne

Les analyses SSCP réalisées sur tous les plants témoins montrent que les communautés fongiques endophytes de la vigne varient en fonction des organes de la vigne : celles des racines sont différentes de celles du tronc du porte-greffe 101.14, de celles des tiges du cépage Cabernet Sauvignon et ce, quel que soit le type de sol dans lequel a poussé la vigne (figure 74).

Les résultats de la figure 74 mettent en évidence l'absence de différence entre les témoins percés et non percés, c'est pourquoi, nous regrouperons par la suite les deux types d'échantillons sous l'appellation de « témoins ». Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 45% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Comme l'analyse en composante principale ne semble pas indiquer de différence significative des communautés fongiques en fonction du type de sol (figure 78), nous choisissons d'analyser plus précisément ce qui se passe au sein de chaque organe de la vigne étudié.

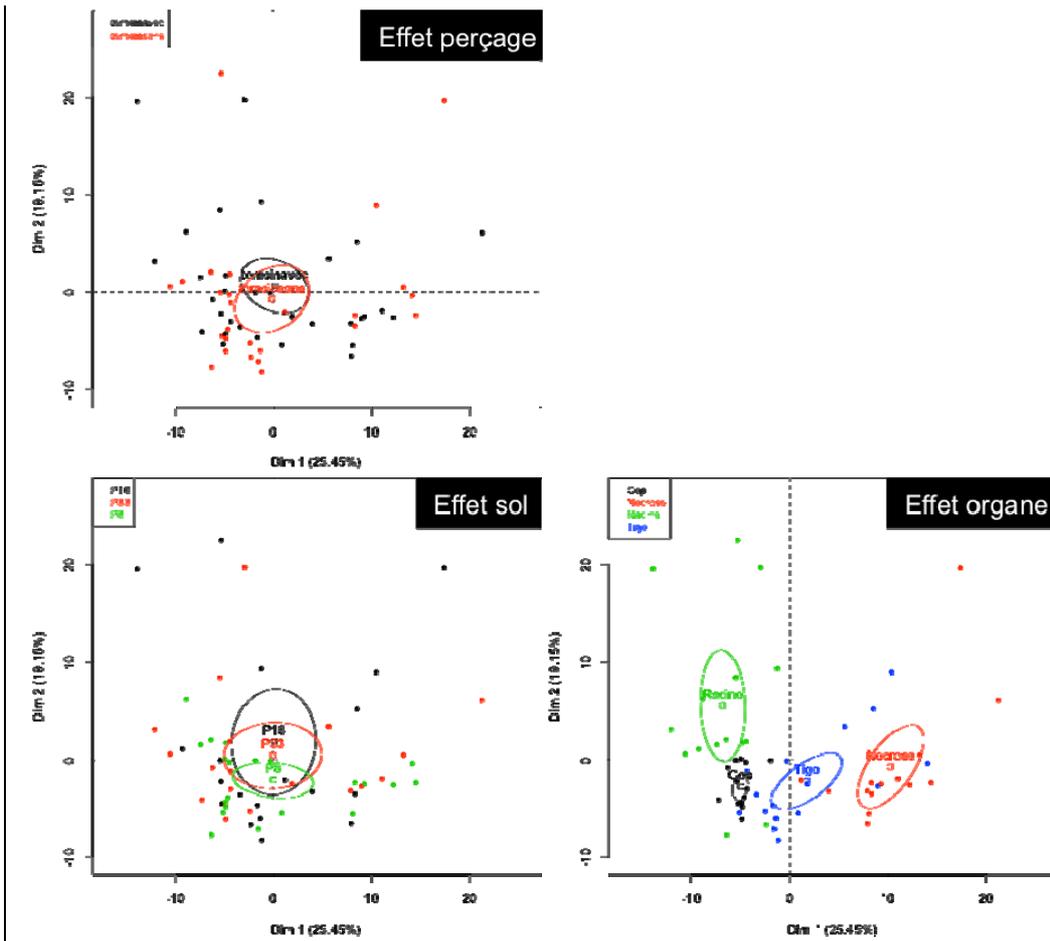


Figure 78: Analyse en composantes principales des populations fongiques dans différents organes de plantes témoins de Cabernet Sauvignon greffés sur 101.14 en fonction du sol. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 45% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

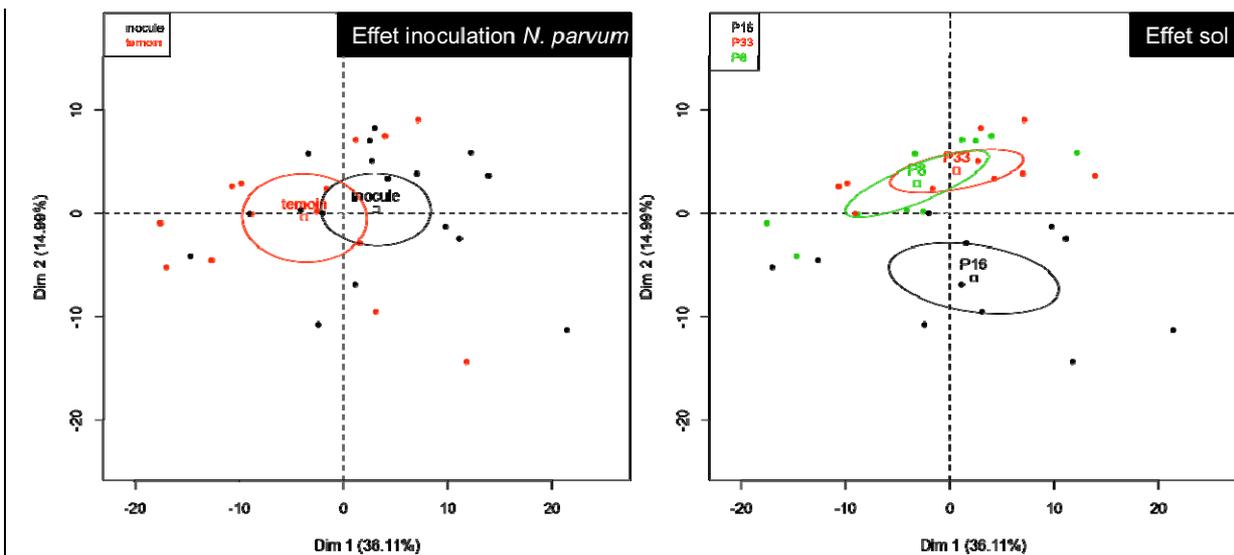


Figure 79: Analyse en composantes principales des populations fongiques dans les racines de 101.14 en fonction du sol. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 51% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Au niveau des racines, il n'y a pas de différences dans la structure des communautés fongiques entre les plants témoins et ceux dont le cep a été inoculé par *Botryosphaeria sp.* (figure 79). Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 51% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Les racines montrent qu'il y a un effet du type de sol sur la variabilité de la communauté fongique. Ainsi, le sol témoin P16 possède une communauté fongique racinaire différente de celles des 2 autres sols contaminés modérément en cuivre (P8) ou plus fortement (P33). Tandis qu'il n'y a pas de différence de ces communautés racinaires entre P8 et P33 (figure 79). Bien que les racines aient été nettoyées, on ne peut toutefois pas exclure qu'une faible partie de la communauté analysée soit d'origine tellurique, bien qu'une éventuelle contamination tellurique nous semble faible.

Au niveau du cep de 101.14, les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 53% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Il ne semble pas y avoir de différence de communautés fongiques entre les plants témoins et les plants inoculés et ce, quel que soit le type de sol (figure 80). Cela se vérifie également lorsqu'on compare seulement les plants inoculés par *Botryosphaeria sp.* entre eux. Par contre, lorsqu'on ne s'intéresse qu'aux ceps des plants témoins on constate que la communauté fongique de P8 diffère de celle de P33 tandis que celle de P16 est intermédiaire entre les deux autres.

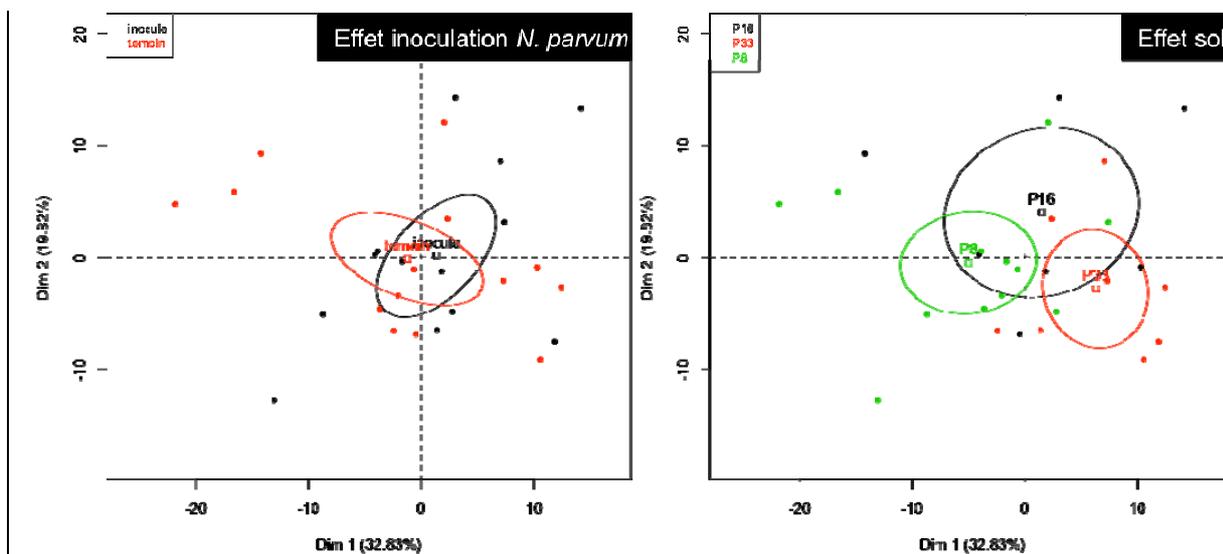


Figure 80: Analyse en composantes principales des populations fongiques dans le cep de 101.14 en fonction du sol. . Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 53% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Lorsqu'on s'intéresse plus particulièrement à la zone du tronc au niveau duquel a eu lieu l'inoculation et où sont localisées les nécroses, les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 42% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Il n'existe plus de différence de communautés fongiques en fonction du type de sol dans lequel a évolué la plante (figure 81). Il n'y a pas non plus de différence significative entre les communautés de plants témoins et ceux de plants inoculés, et cela en dépit de la présence avérée de *Botryosphaeria sp.* dans la zone nécrosée. La présence de *Botryosphaeria sp.* ne modifie donc pas significativement la communauté fongique endophyte du cep au bout de 5 mois.

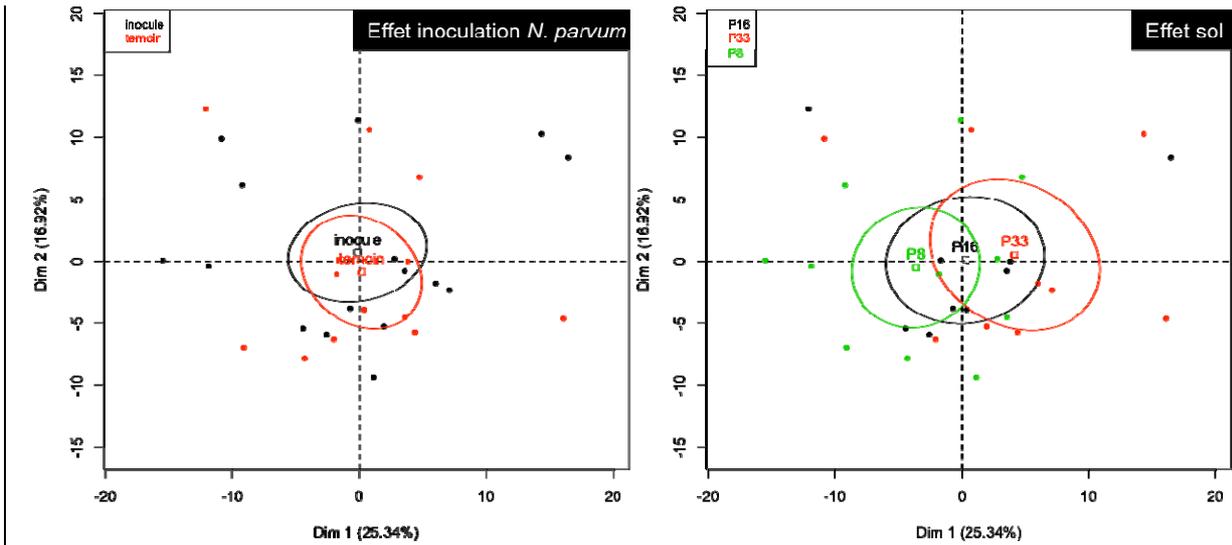


Figure 81: Analyse en composantes principales des populations fongiques dans le cep de 101.14 au niveau du trou d'inoculation de *N. parvum* (appelée zone de nécrose) en fonction du sol. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 42% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

De la même manière, nous n'avons pas observé de différence de communautés fongiques au niveau des tiges de Cabernet Sauvignon entre les plans témoins et les plants inoculés, quel que soit le type de sol (figure 82). Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 46% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés.

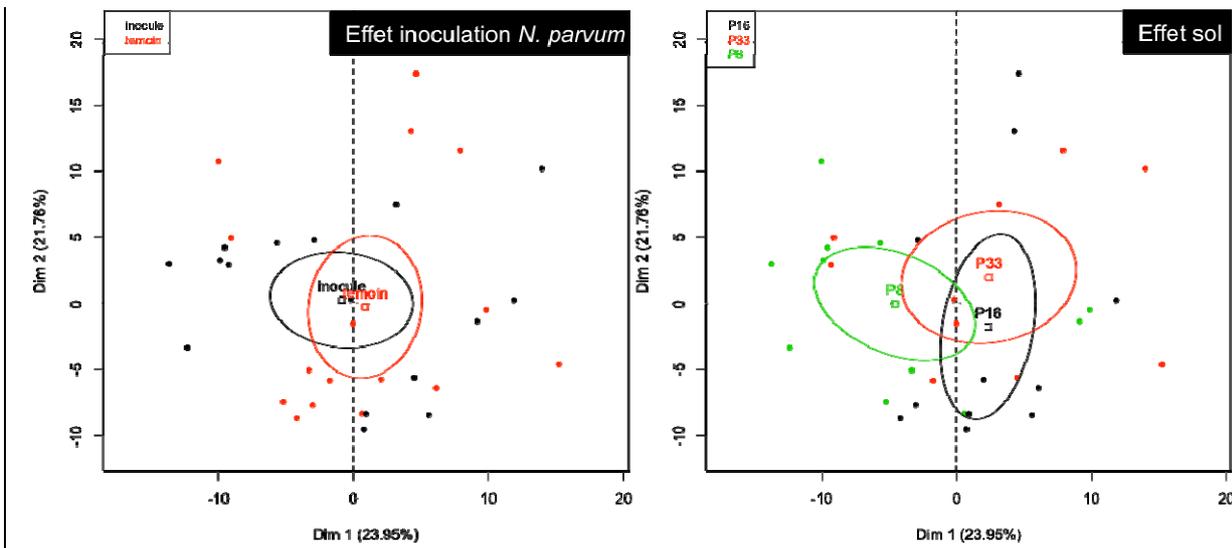


Figure 82: Analyse discriminante en composantes principales des populations fongiques dans les tiges de Cabernet Sauvignon greffés sur 101.14 en fonction du sol. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 46% de la variabilité totale entre les communautés fongiques des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

4.3.2.5 Effets d'une exposition au cuivre sur les communautés bactériennes endophytes de la vigne

Lorsqu'on s'intéresse aux communautés bactériennes endophytes de la vigne, on constate comme pour les champignons qu'il n'y a pas de différence de communautés entre les témoins

percés et non percés (figure 83). Ils seront donc regroupés comme précédemment sous le terme générique de « témoins ».

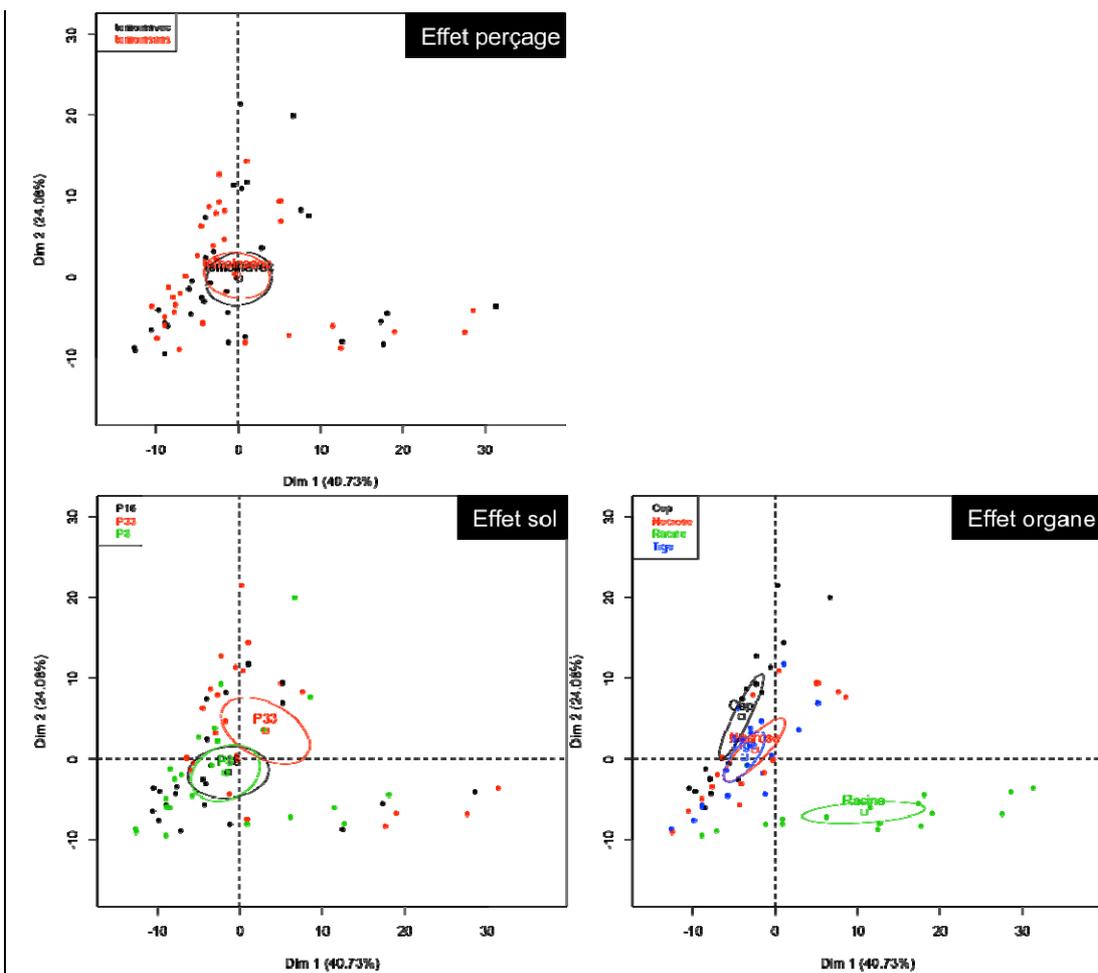


Figure 83: analyse discriminante en composantes principales des populations bactériennes dans différents organes des plantes témoins de cabernet Sauvignon greffés sur 101.14 en fonction du sol. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 65% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 65% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés. L'analyse en composante principale sur les plants témoins montre qu'il existe des différences nettes des communautés bactériennes entre les parties racinaires et les parties aériennes de la vigne (figure 83). Comme il ne semble pas y avoir de différence de communautés bactériennes entre les organes aériens eux-mêmes (cep, zone de nécrose et tige), les organes aériens seront regroupés dans une étude de comparaison sur les parties aériennes. Par contre, il semble y avoir une différence entre les communautés bactériennes des plantes témoins ayant poussé dans le sol P33, le plus contaminé en cuivre, et celles des plantes ayant poussé dans les deux autres types de sol (figure 83).

Une analyse plus spécifique sur les racines, ne fait pas apparaître de différences entre les communautés bactériennes en fonction du type de sol (figure 84) contrairement à ce qu'on ait pu observer précédemment sur les communautés fongiques. Le niveau de contamination en cuivre du sol ne semble donc pas modifier les communautés bactériennes racinaires. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 74% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés.

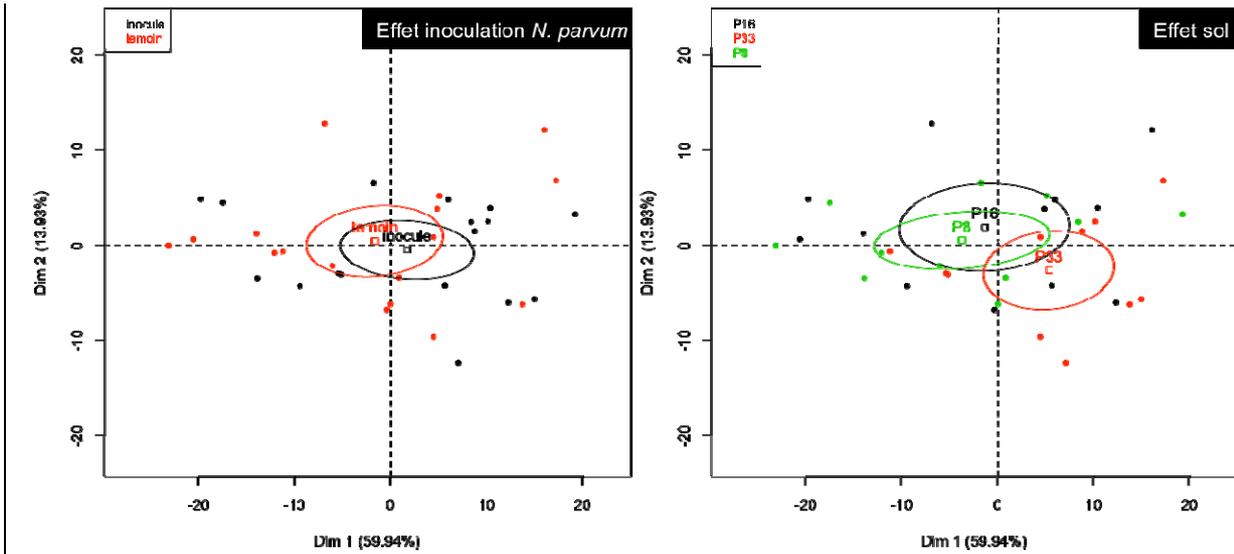


Figure 84: Analyse discriminante en composantes principales des populations bactériennes dans les racines de 101.14 en fonction du sol. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 74% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Pour les parties aériennes, les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 65% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés. Il n'a pas été mis en évidence de différence des communautés bactériennes dans les parties aériennes de plants inoculés par *Botryosphaeria sp.* (figure 85), que ce soit au niveau du porte-greffe (cep, zone de nécrose) ou du cépage (tige).

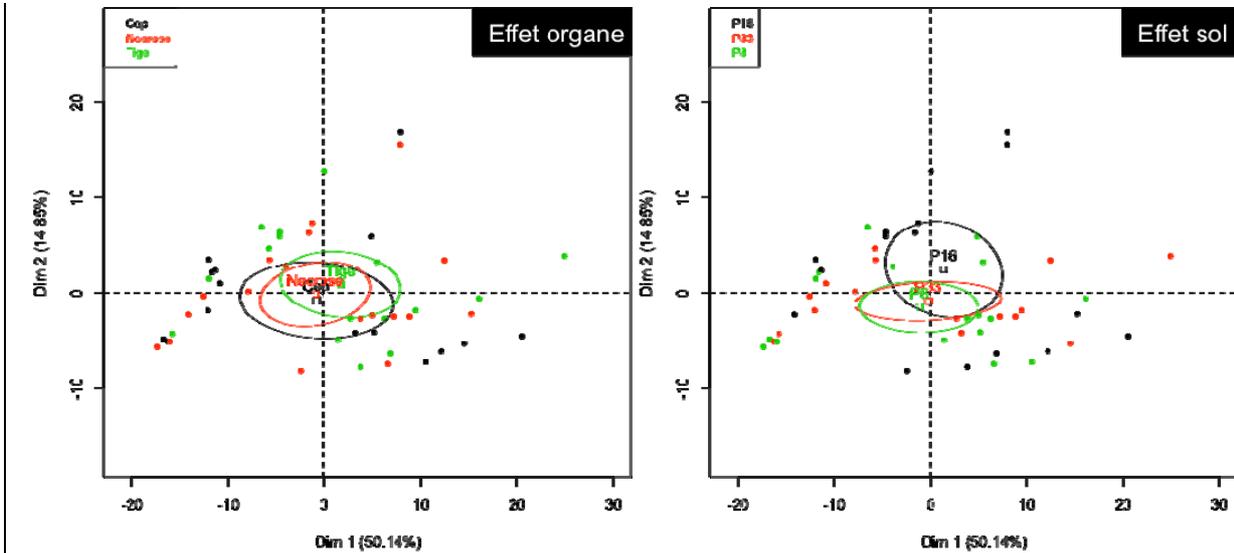


Figure 85: Analyse discriminante en composantes principales des populations bactériennes dans les parties aériennes des plants de Cabernet Sauvignon greffés sur 101.14 après l'inoculation de *N. parvum*. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 65% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Nous avons montré dans la figure 83 que les communautés bactériennes de plantes ayant poussé dans le sol P33 étaient différentes de celles ayant poussé dans les sols P8 et P16. Comme cette différence ne semble pas concerner les communautés bactériennes racinaires d'après la figure 84, nous nous focaliserons seulement sur les communautés bactériennes dans les parties aériennes des plantes ayant poussé dans le sol P33.

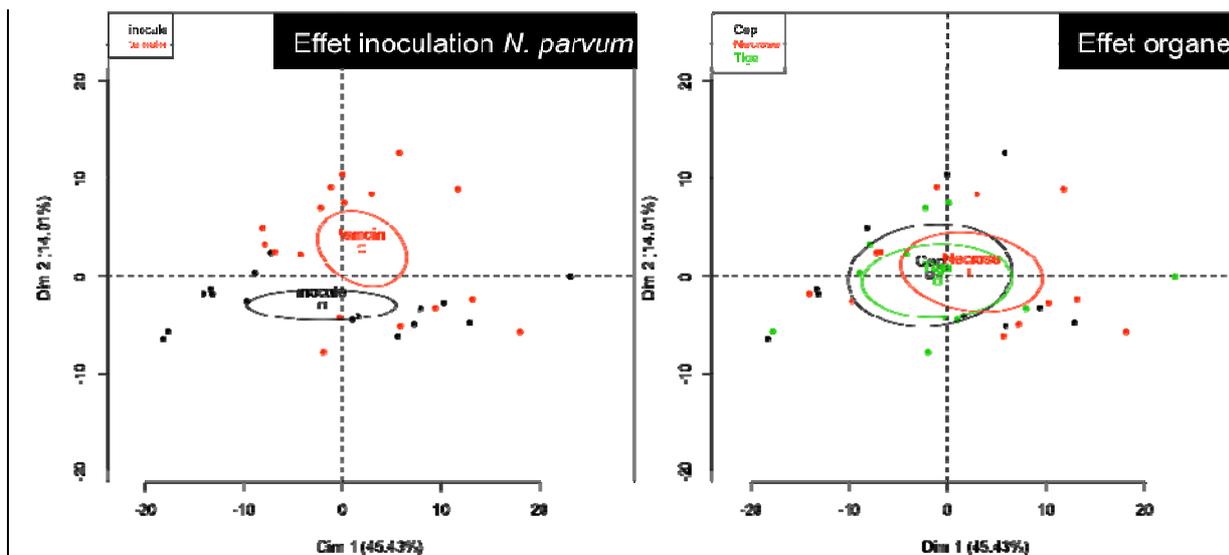


Figure 86: Analyse discriminante en composantes principales des populations bactériennes dans les parties aériennes des plantes de Cabernet Sauvignon greffés sur 101.14 , inoculées par *N. parvum* et rempotées dans le sol P33. Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 59% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Les axes Dim 1 et Dim 2 expliquent 59% de la variabilité totale entre les communautés bactériennes des différents échantillons analysés pour les plants de vigne du sol P33 (figure 86). Il n'y a pas de différence de communautés bactériennes entre les différents organes de plants de vigne ayant poussé dans le sol P33 conformément à ce que nous avons trouvé pour l'ensemble des plants (figure 85). Par contre, en fonction de l'axe 1, il apparaît une différence de communauté bactérienne pour le sol P33 entre les plantes témoins et les plantes inoculées par *Botryosphaeria sp.*. Dans ce cas, une modification de communauté bactérienne pourrait être due à l'effet cumulé d'un sol fortement contaminé en cuivre avec la présence de *Botryosphaeria sp.* dans la vigne.

Le tableau 16 ci-dessous résume l'effet d'une augmentation de la contamination en cuivre du sol sur les différentes communautés endophytes de la vigne.

Tableau 16: Effets de la contamination cuprique dans le sol sur les communautés endophytes bactérienne et fongique de la vigne

	Communautés fongiques	Communautés bactériennes
Racines	Oui	Non
Tronc (zone saine)	Non	Non
Tronc (zone de nécrose)	Non	Oui
Tiges	Non	Non

4.3.3 Discussion

Pour les plants de vigne des sols P16 et P8, les tailles moyennes des nécroses sur les porte-greffés 101.14 de nos plants greffés de Cabernet Sauvignon ont des ordres de grandeurs similaires à celles mesurées sur des boutures franches de Cabernet Sauvignon (Laveau et al., 2009). Par contre les longueurs des nécroses mesurées sur les vignes du sol P33, celui dont la teneur en cuivre disponible est la plus élevée des trois sols testés, sont beaucoup plus importantes. Comme il n'y a pas de différence de taille de nécroses sur les boutures témoins

de nos trois sols, et que les concentrations en cuivre dans les parties aériennes des vignes de ces trois sols ne sont pas significativement différentes, ce n'est donc pas la teneur en cuivre des sols qui induit directement ces nécroses dans la vigne. Par contre les nécroses sont donc bien dues aux inoculations et sont plus ou moins amplifiées par les concentrations en cuivre circulant dans la plante et donc une conséquence des concentrations cupriques du sol.

Les teneurs en cuivre dans les racines de vigne de P33 sont beaucoup plus élevées que dans les racines de vigne des deux autres modalités de sol P8 et P16. Les plants de vigne de P33 sont donc soumis à un stress cuprique plus important que les deux autres. On peut donc supposer que les effets d'un stress cuprique important soient favorables au développement de *N. parvum*.

Plusieurs études ont déjà suggéré qu'un stress environnemental était favorable au développement des maladies du bois (Christen et al., 2007). Il semble par exemple qu'un stress hydrique puisse activer la pathogénicité et la virulence des *Botryosphaeria sp.* et induire également des lésions nécrotiques plus importantes (Van Niekerk et al., 2011). Comme un stress cuprique est souvent perçu par la plante comme un stress hydrique car il induit une perturbation de l'alimentation hydrique de la plante, il est cohérent de trouver des effets nécrotiques similaires à ceux induits par un stress hydrique. En outre, la colonisation puis la dégradation des vaisseaux du xylème par *N. parvum* aggrave d'autant plus le déficit hydrique de la plante (Edwards et al., 2007d cité par Bertsch et al., 2013). *Neofusicoccum parvum* apparaît comme un opportuniste dont la virulence s'exprime lorsqu'il se comporte comme un saprophyte. Son comportement saprophyte pourrait se déclencher au contact de cellules végétales lésées suite à une blessure ou à un stress oxydant.

Le stress oxydant est un moyen de défense fréquemment employé par la plante pour lutter contre une attaque de pathogènes ou en réponse à un stress abiotique et notamment un stress cuprique (Poschenrieder et al., 2006). Une diminution des réserves d'amidon, une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des composés phénoliques et de certains phytoalexines stilbéniques ont été mesurées dans les zones brunes nécrosées caractéristiques de *Botryosphaeria sp.* (Bertsch et al., 2013, Spagnolo et al., 2014). Les ROS contribuent à la destruction des agents pathogènes et induisent la synthèse de la lignine dans la paroi cellulaire. Mais ils sont également délétères pour les cellules végétales. Des processus de résistance au stress oxydatif et de détoxification permettent de conserver l'intégrité des cellules végétales grâce à l'action de la Glutathion-S-transférase et de la superoxyde dismutase (Bowler et al., 1992, Marrs, 1996). Or il semblerait que ces enzymes soient réprimées dans le cas des maladies du bois notamment de l'ESCA (Valtaud et al., 2009, Spagnolo et al., 2012). Le fer intervient également dans le processus de détoxification lorsqu'il est associé à la paroi cellulaire qu'il protège des dégâts oxydatifs (Liu et al., 2007). Or les ROS sont également couramment employés par les pathogènes pour détériorer les parois des cellules végétales dans la lutte pour leur survie. Ainsi, il semble que les champignons responsables de l'ESCA soient en mesure d'utiliser les ROS pour dégrader la lignine et la cellulose par des processus non-enzymatiques (Osti et Di Marco, 2010). On peut supposer que *Botriosphaeria sp.* serait capable d'utiliser des processus similaires pour utiliser les ROS contre les cellules végétales. Le stress cuprique en induisant à la fois une déficience en fer et une production de ROS par la plante fournirait la ressource nécessaire à la mise en place de ce processus et les conditions favorisant *Botryosphaeria sp.* Mais cela reste à démontrer.

Le stress cuprique induit également une augmentation des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes (Chmielowska et al., 2012). Or, il existe une concurrence du flux de carbone entre la voie des stilbènes et la voie des flavonoïdes (Vannozzi et al., 2012). En favorisant la voie des flavonoïdes, le stress cuprique dessert la voie des stilbènes. Or, les cépages présentant les lésions dues à *Botryosphaeria sp.* les moins grandes, se caractérisent par une

plus forte quantité de stilbènes comme le resvératrol et ses homologues. Ces composés interviennent comme molécules de défenses contre les pathogènes mais également comme molécules signal d'activation du système de défense des plantes (Van Loon et al., 2006, Spagnolo et al., 2014). Les polyphénols stilbéniques sont capables de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et ainsi protéger les cellules de la plante contre le stress oxydatif après une attaque pathogène (Bertsch et al., 2013). La faible quantité de ces métabolites de défense de la plante présente dans la zone d'infection par *Botryosphaeria sp.* pourrait expliquer l'inefficacité des défenses contre cette maladie (Spagnolo et al., 2014), et ce, d'autant plus en cas de stress cuprique de la plante.

Les nécroses que nous avons observées progressaient nettement plus vers le bas du cep que vers le haut. Elles n'ont jamais franchi la soudure de greffage située 2 cm en moyenne au dessus du point d'inoculation de *Botryosphaeria sp.*. La soudure de greffage semble donc être un obstacle à la propagation de *Botryosphaeria sp.*. Pourtant, dans d'autres études, le greffage est présenté comme une source de contamination aux *Botryosphaeria sp.* dans les pépinières (Billones-Baaijens et al., 2012, Billones-Baaijens et al., 2013). Cette différence peut s'expliquer par le temps assez long (plusieurs années) nécessaire habituellement à l'installation de cette maladie, puisque notre étude ne porte que sur des observations cinq mois après l'inoculation. Il est possible que *Botryosphaeria sp.* ait besoin de davantage de temps pour franchir la soudure de greffage ou bien que le passage sur le greffon se fasse via la dispersion des pycnides. Dans le cas de notre étude, les pycnides n'étaient pas visibles et n'avaient donc pas pu se disperser vers les parties aériennes. En outre, ce mode de dispersion a lieu généralement après la période hivernale (Amponsath et al., 2011) alors que nous avons récolté les ceps avant l'hiver.

N. parvum apparaît comme un champignon opportunément saprophyte. Si les effets d'un stress cuprique semblent favorables à son développement on peut également se demander si cela n'est pas aussi dû aux éventuels effets délétères du cuivre sur d'autres espèces endophytes de la vigne. Cela présenterait le double avantage de diminuer la compétition avec d'autres espèces endophytes protectrices de la vigne avec *Botryosphaeria sp.* mais aussi de libérer une niche écologique supplémentaire dans le tronc de la plante pour *N. parvum*.

Au niveau racinaire, nos résultats montrent une différence des communautés fongiques entre le sol témoin (P16) et les deux autres sols contaminés au cuivre. La teneur en cuivre disponible dans ces sols et les concentrations en cuivre des racines sont suffisamment élevées pour induire une modification de la communauté fongique racinaire alors que la communauté bactérienne ne semble pas être modifiée. Pourtant les communautés fongiques du sol sont considérées comme moins sensibles à la contamination en cuivre du sol que les communautés bactériennes (Ranjard et al., 2006, Wakelin et al., 2014) grâce à leur grande capacité d'immobilisation extracellulaire du cuivre. D'autres études ont montré des changements dans les communautés bactériennes du sol à partir d'une teneur en cuivre totale supérieure à 100 mg/kg de sol (Diaz-Ravina et al., 2007, Lejon et al., 2008, Viti et al., 2008, Andreazza et al., 2010), ce qui est le cas pour les sols P8 (107 mg/kg) et P33 (325 mg/kg), bien que nous n'ayons pas mis en évidence de différence des communautés bactériennes racinaires. Il est possible que les communautés bactériennes de la rhizosphère de la vigne soient plus tolérantes au cuivre que les communautés bactériennes telluriques. De plus, l'analyse SSCP ne permet pas de mettre en évidence un appauvrissement de la diversité bactérienne ou de quantifier la proportion relative des espèces dans la population bactérienne totale. Il se peut que des différences de proportion entre les communautés bactériennes existent en fonction de la teneur cuprique des sols et des racines, d'autres analyses seraient nécessaires pour le vérifier. Par contre, comme nos résultats montrent une différence des communautés fongiques

racinaires entre le sol témoin et les deux autres sols. Comme pour les populations de rhizobium des légumineuses (Laguerre et al., 2006), il est possible que les populations fongiques de la rhizosphère de la vigne soient plus sensibles aux effets fongicides du cuivre que les communautés fongiques du sol.

Nos résultats montrent des différences des communautés fongiques mais pas de différence de communautés bactériennes entre les organes aériens de la vigne (cep, nécrose, tige). Comme le cep et la zone nécrosée concernent le porte-greffe 101.14 (*V. riparia* x *V. rupestris*) tandis que les tiges appartiennent au greffon de Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*), on peut supposer qu'il existe des communautés fongiques endophytes différentes en fonction des espèces de *Vitis*.

Notre travail n'a pas identifié de modifications des communautés fongiques dans les parties aériennes de la vigne en fonction du niveau de contamination cuprique du sol, que ce soit au niveau du cep, des nécroses ou des tiges. Comme les concentrations en cuivre dans chacun de ces organes ne sont pas différentes en fonction de la teneur en cuivre du sol, on peut considérer la vigne comme un milieu suffisamment tamponné vis à vis du cuivre pour ne pas induire de modifications des communautés fongiques endophytes. Les communautés fongiques endophytes de la vigne seraient aussi peu sensibles aux effets induits par un stress cuprique dans la plante comme un stress oxydant ou une modification de la teneur en acides aminés ou en fer. Comme dans la zone dite de nécrose (lieu d'inoculation de *N. parvum*), il n'y a pas de différence significative des communautés fongiques entre les boutures témoins et les boutures inoculées, on peut supposer que *N. parvum* est aussi présent dans les boutures témoins sans que sa virulence ne s'exprime.

Concernant les communautés bactériennes, elles ne sont pas différentes en fonction des organes de la vigne (pas de différence entre cep et tige) contrairement aux communautés fongiques. Il ne semble donc pas y avoir de communautés bactériennes endophytes spécifiquement adaptées aux différentes espèces de *Vitis*.

Par contre, les différences de communautés bactériennes au niveau de la zone nécrosée trouvées entre les plantes témoins et les plantes inoculées avec *Botryosperia* sp. pour la modalité P33, permettent de supposer un effet simultané d'un stress cuprique et d'une augmentation de la compétitivité pour les ressources par *Botryosphaeria* sp. Cela pourrait se traduire par une augmentation des ROS ou des composés phénoliques, et une modification suffisamment forte du milieu pour induire une modification importante des communautés bactériennes endophytes. Des analyses de pyroséquençage pourraient nous aider à mieux comprendre quelles espèces sont favorisées ou défavorisées par les concentrations élevées en cuivre.

La virulence ou l'agressivité de *N. parvum* pourrait donc être favorisée par les effets induits par un stress cuprique subit par la vigne (production de ROS et de composés phénoliques notamment) mais également par la modification des communautés bactériennes endophytes que cela entraîne.

En conclusion, un stress cuprique subit par la vigne à un niveau modéré semble défavorable aux bio-agresseurs comme *P. viticola* ou *S. titanus* parce qu'il induirait une activation des défenses de la plante non spécifiques avant l'arrivée des bio-agresseurs et donc une plus grande réactivité de la plante en cas d'attaque. Par contre un stress cuprique plus important entraînerait des effets délétères suffisants pour perturber l'ensemble du métabolisme de la plante en diminuant l'efficacité de son système de défense et en modifiant son métabolisme primaire, ce qui devient attractif pour les larves de *S. titanus* et favorables à la croissance et à la sporulation des colonies de *P. viticola*. Les maladies de dépérissements dues aux *Botryosphaeria* sp. induites par *N. parvum* semblent être favorisées par un stress cuprique de

la vigne, même modéré. La virulence de *N. parvum* augmente avec le stress cuprique de la plante. Un stress cuprique élevé de la vigne pourrait provoquer une perturbation plus globale de l'écosystème vigne, notamment en induisant une fragilité des communautés bactériennes endophytes protectrices de la vigne bien que cela reste encore à confirmer, en partie sur des vignes en pleine terre.

Chapitre 5 : Conclusions générales et perspectives

Depuis le Grenelle de l'environnement, le rapport de la société vis à vis de l'environnement a changé et la pollution anthropique des sols est davantage prise en compte. Notre travail de recherches rentre parfaitement dans cette problématique actuelle et il nous a paru important dans ce contexte de s'intéresser aux effets de la contamination cuprique des sols viticoles sur la sensibilité de la vigne aux bio-agresseurs. Ce sujet était exploratoire et original dans la mesure où, à notre connaissance, très peu de travaux publiés, voire aucun, n'avaient entrepris d'étudier la sensibilité de la vigne à des bio-agresseurs dans ce contexte. Ce sujet est donc nécessairement transversal et pluridisciplinaire.

Une disponibilité du cuivre fortement dépendante de la teneur en cuivre complexé d'origine anthropique présent dans le sol

Une étape primordiale a consisté à évaluer le niveau de contamination cuprique des parcelles viticoles en nous focalisant sur l'appellation Pessac-Léognan. La description des caractéristiques physico-chimiques de ces sols était un prérequis pour déterminer les facteurs influençant la disponibilité du cuivre dans ces parcelles. En effet, de nombreuses études ont montré que le pH, la CEC, la teneur en carbonates, en oxydes, en argiles ou en matières organiques pouvaient fortement modifier la disponibilité du cuivre. Ceci s'explique par la forte capacité de complexation et de sorption de ce cation sur les oxydes et les matières organiques, sur les sites négatifs portés par les phases argileuses, ces processus étant dépendants du pH. Selon les études ce sont tantôt le pH, tantôt la matière organique qui influence notablement la disponibilité en cuivre. Nous avons montré que dans le cadre des sols étudiés, l'influence de ces facteurs sur la disponibilité dépend du compartiment du sol considéré et du processus étudié. En effet, pour évaluer la concentration dans la solution du sol assimilable à la disponibilité instantanée du cuivre, les facteurs à prendre en compte sont la concentration totale, le pH et dans une moindre mesure les teneurs en matières organique et en argiles. Ceci s'explique par le fait que l'ion cuivrique peut être en compétition avec le proton dans les équilibres sol-solution. Le cuivre est alors davantage disponible lorsque le pH du sol se situe entre 5,5 et 7,5 ce qui couvre l'intervalle de pH optimum (6 à 8) pour la culture de la vigne. Nous avons montré que le pH a un effet immédiat, à court terme, sur la disponibilité du cuivre. Il pourrait être particulièrement important à prendre en compte lors d'une contamination cuprique ponctuelle, aiguë. Lors d'un traitement cuprique, la disponibilité du cuivre du sol pourrait être instantanément modifiée non seulement par le pH du sol mais aussi par celui de la solution cuprique appliquée. Comme, la rhizosphère peut modifier elle-aussi localement le pH, il est probable que ce pic de cuivre disponible ne soit que temporaire, mais il pourrait être suffisant pour induire un stress à la vigne. Il serait intéressant dans une approche agrosystémique de la vigne de tester cette hypothèse.

Par contre, lorsque nous nous intéressons au cuivre disponible « continu », qui sollicite les processus de résorption et de réalimentation de la solution, alors ce sont la concentration totale du sol, la concentration en carbone et la proportion de particules fines (argiles + limons fins) qui sont les paramètres explicatifs. Ce cuivre disponible réalimentant la solution du sol dépend donc des phases carbonées du sol (matières organiques et carbonates) et des phases fines tandis que le pH n'a plus d'effet significatif dans ce cas. Cette mesure apparaît comme fortement dépendante de la nature du sol. Si on considère, que cette mesure représente le cuivre assimilable par la plante, il faut donc diminuer cette concentration pour limiter la quantité de cuivre absorbable par la vigne. Un apport de matière organique pourrait limiter la disponibilité du cuivre dans les parcelles, bien qu'il nécessite d'être raisonné pour éviter une augmentation trop importante de la vigueur de la vigne. Par contre, un chaulage du sol semble

sans effet immédiat. Toutefois, nous suggérons qu'une étude complémentaire soit faite pour étayer ces résultats et pour mesurer l'influence de la qualité des amendements organiques sur ces sols : En effet, certains amendements organiques sont riches en cuivre, d'autres peuvent modifier le pH et leur qualité peut également perturber les communautés des micro-organismes du sol. Or, plus un sol est contaminé en cuivre, plus l'activité microbienne diminue, plus le processus de minéralisation est ralenti et plus la teneur en matière organique augmente. Afin de ne pas perturber davantage les communautés du sol, il faudrait mesurer l'impact sur plusieurs années des différentes formes d'amendements organiques. Plusieurs facteurs devront être pris en compte pour déterminer la forme d'amendements organiques la plus adaptée comme la compatibilité avec les exigences de la culture de la vigne (viguer), avec ces sols dont le fonctionnement est déjà perturbé par le cuivre, mais aussi la capacité à limiter la disponibilité du cuivre sans interférer négativement sur celles d'autres éléments nutritifs.

Quelle que soit la méthode d'évaluation de la disponibilité du cuivre, nous avons mis en évidence que le facteur prépondérant est la teneur en cuivre complexée du sol, confirmant ainsi ce que d'autres études avaient déjà démontré dans d'autres régions viticoles. Dans les sols viticoles de Pessac-Léognan, le cuivre complexé (extrait à l'EDTA) que nous avons mesuré représente 65% de la teneur en cuivre total du sol. Or, plus la culture de la vigne est ancienne, plus la teneur en cuivre total dans le sol est élevée. Nous avons expliqué que la teneur en cuivre total dépend fortement de l'usage répété des fongicides cupriques et nous avons insisté sur l'importance d'une bonne connaissance de l'historique parcellaire. Il s'agit de connaître à la fois les successions des cultures ayant été pratiquées sur la parcelle (sachant qu'un antécédent viticulture ou arboriculture induit une contamination cuprique de sol) et les techniques de travail du sol ayant été employées (afin de déterminer les horizons du sol les plus contaminés) et enfin si possible les doses et les formes de cuivre apportées. Il est intéressant de montrer que, bien que les sols soient différents, la cinétique d'incorporation est davantage variable en fonction de l'âge des apports. En outre, il existe une multitude de formulations de fongicides cupriques qui ont beaucoup évoluées au cours du temps et dont nous n'avons pas mesuré les effets au cours de ce travail.

L'étude de la disponibilité du cuivre de nos 47 parcelles viticoles nous a permis de trouver une relation multilinéaire qui pourra permettre de prédire la disponibilité du cuivre pour les parcelles viticoles de cette appellation :

Log (teneur en cuivre disponible mesuré par DGT) = 1,33 + 0,82 x log (teneur en cuivre EDTA du sol) - 0,39 x log (teneur en argiles + limons fins) - 0,39 log (teneur en carbone total).

Une analyse de sol fournit généralement les éléments nécessaires à ce calcul, à condition que le prélèvement de terre utilisé soit prélevé dans le bon horizon, soit suffisamment représentatif de l'ensemble de la parcelle et que le prélèvement ne soit pas effectué juste après l'application d'un traitement cuprique. Si l'objectif est de mesurer la concentration dans la solution, il sera nécessaire d'utiliser l'autre relation multilinéaire que nous avons trouvée :

Log (teneur en cuivre total dans la solution du sol) = 3,15 + 0,61 x log (teneur en cuivre EDTA du sol) - 0,30 x log (teneur en argiles) - 0,39 x log (teneur en matières organiques) - 0,15 x pH.

Des mesures in situ devront être effectuées à grande échelle afin de valider et éventuellement d'ajuster ces estimations calculées de la disponibilité du cuivre en vignoble de Pessac-

Léognan. Enfin, ces formules sont adaptées à la typologie des sols de Pessac-Léognan et ne sont donc pas forcément transposables en l'état à d'autres régions viticoles.

Des réponses de la vigne à une contamination cuprique modérée variables selon les cépages

La deuxième étape de cette étude visait d'une part à déterminer la biodisponibilité du cuivre pour la vigne via sa distribution dans la plante, d'autre part à mettre en évidence les premières perturbations métaboliques induites par une contamination cuprique modérée. Nous avons choisi de travailler à des niveaux cupriques modérées correspondant à ceux que nous avons mesurés dans les sols viticoles de la zone étudiée. Nous avons montré que plus la concentration en cuivre de la solution hydroponique augmente, plus la concentration en cuivre augmente dans les racines. Ces résultats sont en accord avec d'autres études réalisées précédemment. Toutefois, nous avons mis en évidence qu'il existe des différences importantes d'absorption du cuivre par les racines selon les cépages et ce même en absence de contamination. Le porte-greffe est parmi les trois cépages testés celui dont la concentration en cuivre des racines est la plus élevée. Or, cette caractéristique n'a jamais été prise en compte jusqu'à maintenant lors de la sélection variétale des porte-greffes. Compte tenu des niveaux de contamination cuprique actuels de certaines parcelles viticoles, il serait utile de tester la sensibilité des porte-greffes à cette contamination. Toutefois, nous n'avons caractérisé ces différences que pour des boutures ayant poussé en perlite, un substrat relativement inerte, maximisant la concentration en métal sous la forme libre, forme assimilable par le végétal. Pour conforter nos résultats, il conviendrait de réaliser une expérimentation similaire avec des boutures placées dans un sol contaminé afin de tenir compte de la réalité des échanges sol-solution, de la spéciation en solution et de la capacité de la rhizosphère à influencer son environnement. Il est possible en effet que certains cépages agissent davantage sur leur environnement que d'autres, par exemple via les exsudats racinaires, ce que nous n'avons pas pris en compte dans cette expérimentation.

La translocation entre les racines et les parties aériennes dépend du cépage. Nous avons également montré que la capacité d'absorption racinaire du cuivre n'est pas corrélée à la capacité de translocation vers les parties aériennes, un cépage absorbant beaucoup pouvant transloquer peu, sûrement grâce à une capacité de stockage important dans les racines, ou à une plus faible concentration en transporteurs agissant à longue distance.

Nous n'avons réalisé nos expérimentations que sur boutures franches bien que la plupart des vignes françaises soient greffées. On peut s'interroger sur l'impact du greffage sur la distribution du cuivre. En effet, la translocation du cuivre est probablement régulée à la fois par les organes aériens puisque le cuivre est un oligo-élément qui intervient notamment dans les photosystèmes, mais aussi probablement par les racines (augmentation de la translocation en cas d'excès de cuivre dans les racines). En cas de greffage, il est possible que l'un ou l'autre de ces organes devienne davantage prépondérant dans cette régulation. Or, une expérimentation que nous avons réalisée par ailleurs sur des Cabernet Sauvignon greffés sur le porte-greffe 101.14 indique que la teneur en cuivre des tiges dans le greffon est supérieure à celle dans le tronc du porte-greffe. Deux hypothèses peuvent expliquer cette différence de distribution du cuivre : (1) elle est due à la différence d'âge entre les organes en supposant que les tiges du greffons soient plus jeunes que le tronc du porte-greffe, ce que nous n'avons pas vérifié ; (2) la translocation du cuivre est davantage régulée par les racines du porte-greffe que par les parties aériennes du greffon. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives l'une de l'autre. Il serait alors judicieux de tester ces hypothèses en réalisant des expérimentations sur des plants greffés de 101.14 portant tantôt du Cabernet Sauvignon, tantôt du Merlot puisque les boutures franches de ces deux cépages se caractérisent par des stratégies de translocation

du cuivre très différentes. Si les transporteurs cellulaires du cuivre sont à actuellement étudiés par plusieurs équipes de recherches, les mécanismes régissant la translocation du cuivre dans la vigne à l'échelle de la plante greffée sont encore mal connus.

Contrairement à d'autres études, il est intéressant de noter que les premiers symptômes induits par nos contaminations cupriques ont été observés non pas sur les racines mais sur les feuilles. Une diminution significative de la croissance des jeunes feuilles a été mesurée mais seulement sur Cabernet Sauvignon, qui semble donc être un cépage plus sensible que les deux autres à une contamination cuprique. Cependant la concentration en cuivre dans tous les jeunes organes augmente brutalement dès que l'exposition cuprique atteint 10 μ M, la distribution du cuivre est donc perturbée à ce niveau de contamination pour tous les cépages. Les jeunes organes sont les premiers impactés par cette contamination. Nous avons également établi qu'une perturbation métabolique intervient en amont d'une modification morphologique lors d'une contamination cuprique. La vigne réagit par l'augmentation de la production d'acides aminés impliqués dans les processus de réponse à un stress cuprique, à un stress hydrique et à une déficience d'assimilation de l'azote. La modification de la composition en acides aminés de la sève semble être un des premiers mécanismes de réponse à la contamination cuprique avant la photosynthèse ou l'absorption du fer. Les symptômes de chlorose ferrique couramment observés lors d'une phytotoxicité cuprique n'apparaissent probablement que plus tardivement par rapport au début du stress cuprique subit par la plante. Cependant, il faut relativiser nos résultats sur le fer. En effet, nous avons réalisé notre expérimentation en situation de carence, après une culture à un niveau suffisant. Dans notre cas, l'apoplasme semble avoir joué un rôle de compartiment réservoir, qui se serait vidé pour alimenter la plante. Ces mécanismes ne seraient pas intervenus dans le cas d'une expérience en sol contaminé, dans lequel la concentration en cuivre et fer est constante au cours de la durée de culture.

Par ailleurs, au cours de nos expérimentations, nous n'avons pas mesuré les perturbations induites par un stress cuprique au niveau du métabolisme secondaire de la vigne. Comme les systèmes des défenses des plantes relèvent du métabolisme secondaire, il serait intéressant de s'y attarder car cela pourrait expliquer en parti les différences de sensibilités entre cépages que nous avons observés. Enfin, compte tenu du niveau de contamination cuprique atteint sur certaines parcelles et de la longévité de la culture de la vigne, il paraîtrait intéressant de tester la sensibilité des cépages et des porte-greffes à une contamination cuprique afin qu'elle soit prise en compte dans l'amélioration de la sélection variétale des cépages.

Des interactions vigne-bio-agresseurs modifiées par les effets induits de la contamination cuprique

Un des objectifs importants de cette thèse consistait à étudier les éventuelles modifications des interactions vigne-bio-agresseurs induites par une contamination cuprique. Les expérimentations que nous avons menées avec *Erysiphe necator*, l'agent pathogène de l'oïdium de la vigne n'ont pas permis de déceler d'effet significatif aux expositions cupriques que nous avons testé. Nous nous sommes limités à présenter des résultats concernant trois bio-agresseurs *Scaphoideus titanus*, *Plasmopara viticola* et *Neofusicocum parvum* vis à vis du Cabernet Sauvignon, le cépage le plus sensible à une contamination cuprique parmi ceux que nous avons étudiés.

Nous avons mis en évidence une diminution de fréquentation des plantes les plus contaminées par les larves de cicadelles, ce qui indique qu'elles sont sensibles aux perturbations de la vigne induites par le cuivre. Nous avons suggéré que cela pouvait s'expliquer par des

différences de pressions osmotiques suite à un stress cuprique, l'augmentation de certains métabolites de défenses ou encore de lignification des parois cellulaires, mais cela nécessite d'être vérifié. Comme nous n'avons mis en contact les larves que 24 heures avec les boutures contaminées, nous n'avons pas testé si la contamination cuprique entraînait des effets à long terme comme des modifications dans le développement ou la survie des larves et des adultes. Comme ce type d'effet a été observé dans d'autres études suite à la modification de la composition en métabolites de défense des plantes, il serait également intéressant de le tester pour le cuivre.

Concernant *P. viticola*, nous avons montré que la contamination cuprique des plants entraînant un ralentissement de son développement et une diminution de sa dynamique de sporulation. Nous supposons donc que l'activation des défenses induites par le stress cuprique avant l'inoculation du pathogène peut expliquer le frein à sa progression. Il est aussi possible que le stress cuprique induise une modification du fonctionnement des stomates défavorable à l'installation du mildiou. Toutefois, nous n'avons pas réalisé d'expérimentations permettant de valider ces hypothèses. Par contre, contre toute attente, lors de la contamination du sol à la dose Cu 10 µM pour le Cabernet Sauvignon, nous avons observé une augmentation de la maladie. L'agressivité du mildiou pourrait donc être modulée en fonction de l'importance de la contamination cuprique. Comme des symptômes de phytotoxicité commencent à apparaître à cette concentration pour ce cépage, il est possible qu'elle induise une perturbation suffisante du fonctionnement global de la plante comme l'inhibition de certaines activités enzymatiques, pour devenir favorable au pathogène. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en mesurant l'expression des gènes ou l'activité des enzymes pour différentes expositions au cuivre de boutures de Cabernet Sauvignon.

Nous avons découvert que la maladie de dépérissements due aux *Botryosphaeria sp.* induite par *N. parvum* est facilitée par un stress cuprique de la vigne, la virulence de *N. parvum* augmentant avec le stress cuprique de la plante. Ce résultat est nouveau et peut présenter un intérêt tout particulier dans la compréhension de l'épidémiologie de la maladie, si toutefois nos résultats se confirment en conditions de vignoble. Nous avons principalement émis deux hypothèses pour expliquer cet effet. Premièrement, *N. parvum* posséderait un processus physiologique qui lui permettrait d'utiliser les espèces réactives de l'oxygène induites par le système de défense de la plante, pour détériorer les parois des cellules végétales. Deuxièmement, le stress cuprique serait défavorable à la survie de bactéries endophytes protectrices de la vigne, capables d'inhiber le développement de *N. parvum* ce qui laisserait toute latitude au pathogène pour se développer. Nos analyses ont conforté la seconde hypothèse puisque nous avons mis en évidence une perturbation des communautés bactériennes au niveau des nécroses du bois, sans toutefois pouvoir identifier les espèces incriminées précisément. Une analyse plus poussée par pyroséquençage est actuellement en cours. Elle devrait apporter prochainement des éléments de réponse dans un sens ou dans l'autre. Toutefois, cela ne remet pas en cause la première hypothèse qui pourrait être validée ultérieurement par des mesures de espèces réactives de l'oxygène mais également d'autres métabolites secondaires de défense. Enfin, nous n'avons jamais trouvé de symptômes de la maladie au delà de la soudure de greffage, il est possible que celle-ci soit un obstacle à la progression de la maladie. Mais les processus rentrant en jeu restent à identifier. En outre, il serait intéressant de tenter de reproduire les résultats obtenus par une infection à *Botryosphaeria sp.* avec d'autres micro-organismes impliqués dans les maladies du bois de la vigne comme par exemple *Eutypa lata*. Sur la base des résultats obtenus dans cette thèse, une étude grandeur nature de tentative de corrélation entre intensité de la maladie et teneur en cuivre du sol à l'échelle du cep est en cours de réflexion entre l'UMR SAVE et l'UMR ISPA.

Nous avons montré que les deux bio-agresseurs foliaires *S. titanus* ou *P. viticola*, étaient plutôt desservis par la contamination cuprique modérée des plants de vigne alors qu'au contraire *N. parvum*, un pathogène du bois était favorisé. La modification des interactions vigne-bio-agresseurs est donc variable selon les espèces de bio-agresseurs, selon les organes cibles de la vigne et en fonction du niveau de contamination. Pour connaître l'impact de la contamination cuprique sur le patho-système, il faudrait donc réitérer ces expériences avec d'autres bio-agresseurs foliaires (*Guignardia bidwellii*), du bois (*Eutypa lata*, *Phaeomonilla chlamydospora*) mais aussi l'étendre à des bio-agresseurs de la grappe (*Lobesia botrana*, *Eupoecilia ambiguella*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila suzukii*, *Botrytis cinerea*) et des racines (*Daktulosphaera vitifoliae*) ainsi qu'aux phytoplasmes et aux virus qui s'attaquent à la plante entière. Enfin, comme le suggère notre expérimentation avec *N. parvum*, un stress cuprique élevé de la vigne pourrait provoquer une perturbation plus globale de l'écosystème vigne, notamment en induisant des effets délétères vis à vis des communautés endophytes protectrices de la vigne. Bien que les communautés endophytes de la vigne soient encore mal connues, des études plus poussées sur ce sujet permettraient d'étayer cette hypothèse.

Le tableau 17 ci-dessous résume l'ensemble de nos résultats, en présentant l'effet d'une augmentation de la contamination en cuivre du sol sur les différents facteurs étudiés.

Tableau 17: Récapitulatif des conséquences d'une contamination cuprique du sol pour l'écosystème vigne

Cuivre échangeable (complexé)	Augmentation
Cuivre dans la solution du sol	Augmentation
Cuivre disponible dans le sol	Augmentation
Absorption racinaire du cuivre	Augmentation
Translocation du cuivre vers les organes aériens	Augmentation pour les organes en croissance
Absorption et distribution du zinc	Pas de modification
Absorption et distribution du fer	Pas de modification
Composition chimique de la sève	Pas de modification des teneurs en sucres Modification de la teneur en 5 acides aminés
<i>Scaphoideus titanus</i>	Baisse de fréquentation
<i>Plasmopara viticola</i>	Ralentissement de la croissance et diminution de la sporulation
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Virulence accrue
Communautés endophytes fongiques racinaires	Modifications des communautés
Communautés endophytes fongiques du tronc	Pas de modification
Communautés endophytes fongiques du tronc en présence de nécroses	Pas de modification
Communautés endophytes fongiques de la tige du greffon	Pas de modification
Communautés endophytes bactériennes racinaires	Pas de modification
Communautés endophytes bactériennes du tronc	Pas de modification
Communautés endophytes bactériennes du tronc en présence de nécroses	Modifications des communautés (résultats préliminaires ADN global à confirmer par pyroséquençage)
Communautés endophytes bactériennes de la tige du greffon	Pas de modification

Ce bilan n'est valable que pour les niveaux de contaminations cupriques que nous avons testés et pour les cépages utilisés. Il est possible que des contaminations cupriques plus importantes induisent des effets différents.

Perspectives

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence la nécessité d'intensifier les recherches sur l'utilisation du cuivre et ses effets secondaires sur la vigne, ses communautés endophytes et son patho-système. Pour cela une vision macroscopique, la plus intégrée possible est nécessaire, bien qu'elle soit difficile à mettre en œuvre compte tenu des nombreuses disciplines concernées. Afin de prendre en compte toute la complexité de l'écosystème vigne, l'idéal serait d'étendre les recherches aux espèces impliquées dans les relations tri-trophiques de la vigne comme les parasitoïdes, les prédateurs, mais aussi plus largement les symbiontes des bio-agresseurs. L'impact sur les communautés rhizosphériques de la vigne devrait également être étudié.

Il serait également nécessaire de confirmer nos résultats concernant les effets d'un stress cuprique (modifications du système de défense, du fonctionnement des stomates, du métabolisme primaire, de la lignification des parois cellulaires). La mobilisation du système de défense général des plantes lors d'un stress cuprique, pourrait entraîner une diminution du système de défense plus spécifique à un pathogène donné compte tenu de son coût métabolique, et par conséquent accroître la sensibilité de la vigne aux bio-agresseurs. Il serait nécessaire d'évaluer les effets coûts/bénéfices pour la plante d'un stress cuprique chronique, comme c'est le cas pour les parcelles en production, afin d'avoir une vision la plus intégrée possible.

Nous avons suggéré plusieurs pistes pour limiter la biodisponibilité du cuivre en vignoble (travail du sol, amendements, sélection variétale) qui pourraient être mises en œuvre rapidement pour répondre aux attentes des viticulteurs à ce sujet. Néanmoins cela nécessiterait au préalable des expérimentations complémentaires pour valider nos propositions, qui pourraient être réalisées en partenariat avec les instituts techniques agricoles et les viticulteurs. Des outils d'aide à la décision pour le choix des itinéraires techniques pourraient ainsi se développer.

Peu de données existent sur l'évolution de la disponibilité du cuivre dans le sol en fonction des aléas climatiques. Néanmoins, comme les maladies du dépérissement dues à *Botryosphaeria sp.* semblent se développer suite à un stress hydrique ou un stress cuprique (ce qui est nouveau), il serait intéressant d'étudier comment évolue la disponibilité du cuivre dans le sol en fonction de différentes conditions climatiques tout en tenant compte des effets que ces conditions climatiques induisent également sur le fonctionnement biologique du sol (minéralisation notamment). De même, les conséquences du réchauffement climatique sur la disponibilité du cuivre ainsi que sur les cinétiques d'absorption et de translocation dans la plante n'ont pas encore été étudiées.

Sans toutes ces données, il est difficile d'avoir une vision claire du bénéfice/coût de l'utilisation du cuivre en viticulture. Néanmoins, il paraît difficile de se passer complètement de fongicide cuprique aujourd'hui. Son utilisation doit donc être la plus limitée possible et la recherche de modes de lutte alternatifs poursuivie. Nous insistons également sur la nécessité à l'avenir d'avoir une vision la plus intégrée possible du système, ce qui nécessitera d'intensifier les interactions entre les disciplines de recherches notamment entre agronomie et écologie évolutive.

Références bibliographiques

- Agbenin J.O., Felix-Henningsen P., 2004. Dynamics of copper fractions and solubility in a savanna soil under continuous cultivation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 68, 117-125.
- Aldrich A.P., Kistler D., Sigg L., 2002. Speciation of Cu and Zn in drainage water from agricultural soils. *Environmental Science and Technology*, 36, 4824-4830.
- Ali N.A., Bernal M.P., Ater M., 2002. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, 239, 103-111.
- Allègre M., Heloir M.C., Trouvelot S., Daire X., Pugin A., Wendehenne D., Adrian M., et al., 2009. Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 8, 977-986.
- Alonso C., Garcia I.M., Zapata N., Perez R., 2009. Variability in the behavioural responses of three generalist herbivores to the most abundant coumarin in *Daphne laureola* leaves. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132, 76-83.
- Amponsath N.T., Jones E.E., Ridgway H.J., Jaspers M.V., 2011. Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *Ur J. Plant Pathol.*, 131, 467-482.
- Amtmann A., Troufflard S., Armengaud P., 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiology Plant*, 133, 682-691.
- Andreazza, R., Pieniz, S., Wolf, L., MingKuo, L., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., 2010. Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. *Science of the Total Environment* 408, 1501-1507.
- Angelini E., Negrisol E., Clair D., Borgo M., Boudon-Padieu E., 2003. Phylogenetic relationships among Flavescence doree strains and related phytoplasmas determined by heteroduplex mobility assay and sequence of ribosomal and nonribosomal DNA. *Plant Pathology*, 52, 663-672.
- Angelova V.R., Ivanov A.S., Braikov D.M., 1999. Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil – grapevine – grape. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 713–721.
- Arduini I., Godbold D.L., Onnis A., 1994. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. *Physiol. Plant*, 92, 675-680.
- Arias M., Lopez E., Soto B., 2005. Copper distribution and fractionation in aggregate fractions from vineyard soils: comparison with zinc. *Agrochimica*, 49, 60-69.
- Arnaud G., Malembic-Maher S., Salar P., Bonnet P., Maixner M., Marcone C., Boudon-Padieu E., Foissac X., 2007. Multilocus sequence typing confirms the clone genetic interrelatedness of three distinct Flavescence Dorée Phytoplasma strain clusters and group 16SrV Phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73,12, 4001-4010.
- Ash C., Vacek O., Jaksik O., Tejnecky V., Drabek O., 2012. Elevated soil copper content in a bohemian vineyard as a result of fungicide application. *Soil and Water Res.*, 4, 151-158.
- Awmack C.S. et Leather R.S., 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 47, 817-844.

- Bagdatlioglu N., Nergiz C., Ergonul P.G., 2010. Heavy metal levels in leafy vegetables and some selected fruits. *J. Verbrauch Lebensm.*, 5, 421-428.
- Baize D et Jabiol B., 1995. Guide pour la description des sols. Inra Editions, Paris, 375 p.
- Baize D., Tercé M., 2002. Les éléments traces métalliques dans les sols. Approches fonctionnelles et spatiales. Inra Editions, Paris, 565 p.
- Baize D., Saby N., Walter C., 2006. Le cuivre extrait à l'EDTA dans les sols de France : probabilités de carences et de toxicités selon la BDAT. *Etude et Gestion des Sols*, 13, 4, 259-268.
- Baker D.E., Senft J.P., 1995. Copper. Heavy metals in soils. Ed. Alloway, 2nd Edition, Blackie academic and professional, 368 p.
- Baldwin I.T. et Karban R, 1997. Induced responses to herbivory. Chicago University Press, Chicago.
- Banas, D., Marin, B., Skraber, S., Chopin, E.I.B., Zanella, A., 2010. Copper mobilization affected by weather conditions in a stormwater detention system receiving runoff waters from vineyard soils (Champagne, France). *Environmental Pollution*, 158, 476-482.
- Banci L., Bertini I., Ciofi-Baffoni S., Kozyreva T., Zovo K., Palumaa P., 2010. Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*, 465, 3, 645-650.
- Bart P.H.J.T., Eggermont K., Penninckx I.A.M.A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B.P.A., Broekaert W.F., 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Plant Biology*, 95, 15107-15111.
- Baskarathevan J., Jaspers M.V., Jones E.E., Ridgway H.J., 2013. Development of isolate-specific markers for *Neofusicoccum parvum* and *N. luteum* and their use to study rainwater splash dispersal in the vineyard. *Plant Pathology*, 62, 501-509.
- Bastos C.S., Cardoso-Galvao J.C., Coutinho Picanco M., Gomes Pereira P.R., Cecon P.R., 2007. Nutrient content affecting *Spodoptera frugiperda* and *Dalbulus maidis* occurrence in corn. *Insect Science*, 14, 117-123.
- Beanland L., Noble R., Wolf T.K., 2006. Spatial and temporal distribution of North American grapevine yellows disease and of potential vectors of the causal phytoplasmas in Virginia. *Environmental Entomology*, 35, 332-344.
- Becker J., Makus P., Schrader S., 2001. Interactions between soil micro- and mesofauna and plants in a ecofarming system. *Eur. J. Soil. Boil.*, 37, 245-249.
- Belhadj A. Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet M.F., Merillon J.M., 2006. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9119-9125.
- Belli G., Bianco P.A., Conti M., 2010. Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology*, 92, 303-326.
- Bengtsson G., Gunnarsson T., Rundgren S. 1985. Influence of metals on reproduction, mortality and population growth in *Onychiurus armatus* (collembola). *Journal of Applied Ecology*. 22, 3, 967-978.
- Benito A., Romero I., Dominguez N., Garcia-Escudero E., Martin I., 2013. Leaf blade and petiole analysis for nutrient diagnosis in *Vitis vinifera* L. cv. Garnacha tinta. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 285-298.

- Bernays E.A. et Chapman R.F., 1994. Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman and Hall, New York, NY, USA, 312 p.
- Besnard E., Chenu C., Robert M., 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environmental Pollution*, 112, 329–337.
- Bert P.F., Bordenave L., Donnart M., Hevin C., Ollat N., Decroocq S., 2013. Mapping genetic loci for tolerance to lime-induced iron deficiency chlorosis in grapevine rootstocks (*Vitis* sp.). *Theor. Appl. Genet.*, 126, 451-473.
- Bertsch C., Ramirez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clement C., Fontaine F., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Review. Plant Pathology*, 62, 243-265.
- Bi J., Castle S., Toscano N., 2007. Amino acid fluctuations in young and old orange trees and their influence on glassy-winged sharpshooter (*Homalodisca vitripennis*) population densities. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1692-1706.
- Billones-Baaijens R., Ridgway H.J., Jones E.E., Cruickshank R.H., Jaspers M.V., 2012. Prevalence and distribution of Botryosphaeriaceae species in New Zealand grapevine nurseries. *Eur. J. Pathol.*, 135, 175-185.
- Billones-Baaijens R., Jones E.E., Ridgway H.J., Jaspers M.V., 2013. Virulence affected by assay parameters during grapevine pathogenicity studies with Botryosphaeriaceae nursery isolates. *Plant Pathology*, 62, 1214-1225.
- Billones-Baaijens R., Jones E.E., Ridgway, H.J., Jaspers M.V., 2014. Susceptibility of common rootstock and scion varieties of grapevines to Botryosphaeriaceae species. *Australian Plant Pathology*, 43, 1, 25-31.
- Bonfils J. et Schvester D., 1960. Les cicadelles (Homoptera Auchenorrhyncha) dans leurs rapports avec la vigne dans le Sud-Ouest de la France. *Annales des Epiphyties*, 3, 325- 336.
- Boubakri H., Wahab M.A., Chong J., Bertsch C., Mliki A., Soustre-Gacougnolle I., 2012. Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defense responses, including HR like-cell death. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 120-133.
- Boudon-Padieu E., Larrue J., Caudwell A., 1989. ELISA and dot-blot detection of Flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Current Microbiology*, 19, 357-364.
- Bourrelhier P.H., Berthelin J., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. Académie des Sciences, rapport 42, août 1998, Lavoisier Tec et Doc., 440p.
- Bowler C., Van Montagu M., Inzé D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 83-116.
- Branas J., 1984. Histoire et fonction du cuivre dans la viticulture de qualité. *Le Progrès Agricole et Viticole*, 22, 521-523.
- Bravin M., 2008. Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole. Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, MontpellierSupAgro, 203 p.
- Bressan A., Clair D., Sémétey O., Boudon-Padieu E., 2005a. Effect of two strains of Flavescence dorée phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 144-149.

- Bressan A., Spiazzi S., Girolami V., Boudon-Padieu E., 2005c. Acquisition efficiency of Flavescence dorée phytoplasma by *Scaphoideus titanus* Ball from infected tolerant or susceptible grapevine cultivars or experimental host plants. *Vitis*, 44, 143-146.
- Bressan A., Larrue J., Padieu E.B., 2006. Patterns of phytoplasma-infected and infective *Scaphoideus titanus* leafhoppers in vineyards with high incidence of Flavescence dorée. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119, 61-69.
- Briat J.F. et Lebrun M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Compte rendu de l'Académie des Sciences, série III- Sciences de la vie*, 322, 1, 43-54.
- Brookes P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol Fertil Soils*, 19, 269-279.
- Bruce T.J.A., Wadhams J.L., Woodcock C.M., 2005. Insect host location : a volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10, 6, 269-274.
- Brun L.A., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy J.C., 1998. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution*, 102, 151-161.
- Brun L.A., Maillet J., Hinsinger P., Pepin M., 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution*, 111, 293-302.
- Buenafior H.G., Sexena R.C., Heinrichs E.A., 1981. Biochemical basis of insecticide-induced brown planthopper resurgence. *Int. Rice Res. Newslett*, 6, 4, 3-14.
- Burgess D.R. et Hepworth G., 1996. Examination of sclerotial germination in *Sclerotinia minor* with an in vitro model. *Can. J. Bot.*, 74, 450-455.
- Camara C.K., Camara S., Paz M., Barbosa G., Angelica M., 2013. Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*, 52, 2, SI, 380-387.
- Cambrolle J., Garcia J.L., Ocete R., Figueroa M.E., Cantos M., 2013. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. *Chemosphere*, 93, 294-301.
- Carton Y., Sorensen C., Smith J., Smith E., 2007. Une coopération exemplaire entre entomologistes français et américains pendant la crise du Phylloxera en France (1868–1895). *Ann. soc. entomol. Fr.*, 43, 103-125.
- Casali C. A., Moterle D. F., Rheinheimer D. S., Brunetto G., Corcini A. L. M., Kaminski J., 2008. Copper forms and desorption in soils under grapevine in the Serra Gaúcha of Rio Grande do Sul. *R Bras Ci Solo*, 32, 1479–87.
- Cattani I., Fragoulis G., Boccelli R., Capri E., 2006. Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere*, 64, 1972-1979.
- Caudwell A., 1964. Identification d'une nouvelle maladie à virus de la vigne, la « Flavescence dorée ». Etude des phénomènes de localisation des symptômes et de rétablissement. *Annales des Epiphyties*, 15, 193 pp.
- Caudwell A., Kuszala C., Bachelier J.C., Larrue J., 1970. Transmission de la Flavescence dorée de la vigne aux plantes herbacées par l'allongement du temps d'utilisation de la cicadelle *Scaphoideus littoralis* BALL et l'étude de sa survie sur un grand nombre d'espèces végétales. *Annales de Phytopathologie*, 2, 415-428.
- Caudwell A. et Larrue J., 1986. La flavescence dorée dans le Midi de la France et dans le Bas-Rhône. *Le Progrès Agricole et Viticole*, 103, 517-523.

- Caudwell A., Larrue J., Tassart V., 1994. Caractère "porteur de la flavescence dorée" chez les vignes porte-greffes, en particulier le 3309 Couderc et le Fercal. *Agronomie*, 2, 83-94.
- Cetois A., Quesnoit M., Hinsinger P., 2003. Soil copper mobility and availability. A review, 110p.
- Chaignon V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse, Université de droit, d'économie et des sciences, Aix-Marseille III, 183 p.
- Chaignon V., Bedin F., Hinsinger P., 2002. Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and on a calcareous soil. *Plant and Soil*, 243, 219-228.
- Chaignon V., Sanchez-Neira I., Herrmann P. Jaillard B., Hinsinger P. 2003. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environmental pollution*, 123, 229-238.
- Chapman R.F., 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 48, 455-484.
- Chelliah S. et Heinrichs E.A., 1980. Factors affecting insecticide induced resurgence of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* on rice. *Environ. Entomol.*, 9, 773-777.
- Chen Y.Z., Lin L., Wang C.W., Yeh C.C., Hwang S.Y. 2004. Response of two Pieris (Lepidoptera: Pieridae) species to fertilization of a host plant. *Zoological Studies*, 43, 778 - 786.
- Chen S., Morgan D.P., Hasey J.K., Anderson K., Michailides T.J., 2014. Phylogeny, morphology, distribution and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English Walnut in California. *Plant disease*, 98, 5, 636-652.
- Chmielowska J., Veloso J., Gutierrez J., Silvar C., Diaz J., 2010. Cross-protection of pepper plants stressed by copper against a vascular pathogen is accompanied by the induction of a defense response. *Plant Science*, 178, 176-182.
- Chopin E.I.B., Marin B., Mkoungafoko R., Rigaux A., Hopgood M.J., Delannoy E., Cancès B., Laurain M. 2008. Factors affecting distribution and mobility of trace elements (Cu, Pb, Zn) in a perennial grapevine (*Vitis vinifera* L.) in the Champagne region of France. *Environmental Pollution*, 156, 1092-1098.
- Choudhary N.L., Sairam R.K., Tyagi A., 2005. Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 42, 366-370.
- Christen D., Schönmann S., Jermini M., Strasser R.J., De fago G., 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 504-14.
- Christensen N.M., Axelsen K.B., Nicolaisen M., Schulz A., 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10, 526-535.
- Chuche J. et Thiéry D., 2009. Cold winter temperatures condition the egg- hatching dynamics of a grape disease vector. *Naturwissenschaften*, 96, 827-834.
- Chuche J., 2010. Comportement de *Scaphoideus titanus*, conséquences spatiales et démographiques. Université Bordeaux 2, 214 p.

- Chuche J., Desvignes H., Bonnard O., Thiéry D., 2014. Phenological synchrony between *Scaphoideus titanus* (Hemiptera : Cicadellidae) hatchings and grapevine bud break : could this explain the insect's expansion. *Bulletin of Entomological Research* (in press).
- Chuche J. et Thiéry D., 2014. Biology and ecology of the Flavescence Dorée vector *Scaphoideus titanus* : a review. *Agron. Sustain. Dev.*, 34, 381-403.
- Ciscato M., Valcke R., VanLoven K., Clijsters H., Navari-Izzo F., 1997. Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 100, 901-908.
- Clay N.K., Adio A.M., Denoux C., Jander G., Ausubel F.M. 2009. Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science*, 323, 95-101.
- Clemens S., 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212, 475-486.
- Cluzeau D., Lebouvier M., Trehen P., Bouche M.B., Badour C., Perrudud fL., 1987. Relations between earthworms and agricultural practices in the vineyards of Cham- pagne. Preliminary results. On Earthworms Selected Symposia and Monographs, Eds Bonvicini Pagliai A.M., Omodeo P., U.Z.I., 2, 465-484.
- Coïc Y., Coppenet M., 1989. Les Oligoéléments en Agriculture et Elevage. Incidences sur la Nutrition Humaine. INRA, Paris, 136p.
- Coley P.D., Bateman, M. L., Kursar T.A., 2006. The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos*, 115, 219-228.
- Collins N.C., Thordal-Christensen H., Lipka V., Bau S., Kombrink E., Qiu, J.L., Hückelhoven R., Stein M., Freialdenhoven A., Sommerville S.C., and Schulze-Lefert P., 2003. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 425, 973-977.
- Cornu J.Y., Staunton S., Hinsinger P., 2007. Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *plant and Soil*, 292, 63-77.
- Cortet J., Gomot de Vauflery A., Poinot-Balaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *Eur. J. Soil Biol.*, 35, 115-134.
- Courde L., 2000. Etude des effets d'applications répétées de cuivre sur l'activité et la diversité de la microflore des sols. Université de Bourgogne, Dijon, 92 p.
- Crotti E., Rizzi A., Chouaia B., Ricci I., Favia G., Alma A., Sacchi L., Bourtzis K., Mandrioli M., Cherif A., Bandi C., Daffonchio D., 2010. Acetic Acid Bacteria, Newly Emerging Symbionts of Insects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 21, 6963-6970.
- Dagostin S., Scharer H.J., Pertot I., Tamm L., 2011. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection*, 30, 776-788.
- Dai G.H., Andary C., Mondolot-Cosson L., Boubals D., 1995. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 46, 177-188.
- Darrietort G., Lecomte P., 2007. Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 50-7.

- Davis R.D., Beckett P.H.T., 1978. Upper critical levels of toxic elements in plants. II. Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass. *New Phytologist*, 80, 23-32.
- Decante D., Van Leeuwen C., Van Helden M., 2009. Influence of plot characteristics and surrounding vegetation on the intra-plot spatial distribution of *Empoasca vitis*. *Agricultural and Forest Entomology*, 11, 377-387.
- Delas J., 1963. La toxicité du cuivre accumulé dans les sols. *Agrochimica*, 7, 258-288.
- Delas J., Juste C., Langon M., 1975. Biological stability of different metallic humates. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, série D*, 281, 22, 1685-1688.
- Delmas J., 1980. Les sols de vignoble. *Sciences et techniques de la vigne*, Eds J. Ribéreau-Gayon et E. Peynaud, Paris, Dunod, 549-616.
- Deluisa A., Giandon P., Aichner M., Bortolami P., Bruna L., Lupetti A., 1996. Copper pollution in Italian vineyard soils. *Commun Soil Sci Plant Anal.*, 27, 1537-48.
- Desneux F., 2013. Les toxines des plantes. Interactions insectes-plantes, partie 5. Eds Sauvion N., Calatayud P.A., Thiéry D., Marion-Poll F., IRD/Quae/ publ., 423-427.
- Dethier V.G., 1982. Mechanism of host-plant recognition. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 31, 49-56.
- Diamond S.E., et Kingsolver J.G., 2011. Host plant quality, selection history and tradeoffs shape the immune responses of *manduca sexta*. *Proceedings of the Royal Society B*, 278, 289-297.
- Diaz I., Del Campillo M.C., Cantos M., 2009. Iron deficiency symptoms in grapevine as affected by the iron oxide and carbonate contents of model substrates. *Plant Soil*, 322, 293-302.
- Diaz, Gonzalo A., Latorre, Bernardo A., 2013. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*, 46, 106-112.
- Díaz-Raviña M., Calvo de Anta R., Bååth E., 2007. Tolerance (PICT) of the bacterial communities to copper in vineyards soils from Spain. *J Environ Qual.*, 36, 1760-4.
- Dietrich R., Ploss K., Heil M., 2004. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment*, 27, 896- 906.
- Diez-Navajas A.M., Wiedemann-Merdinoglu S., Greif C., Merdinoglu D., 2008. Nonhost versus host resistance to grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. *Phytopathology*, 98, 776-780.
- Directive 2009/37/CE de la commission du 23 avril 2009 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil pour y inclure le chlormequat, les composés de cuivre, le propaquizafop, le quizalofop-P, le teflubenzuron et la zéta-cyperméthrine comme substances actives. *Journal officiel de l'Union européenne* du 24 avril 2009.
- Drobne D., 1997. Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1159-1164.
- Dubos B., 2002. Maladies cryptogamiques de la vigne: Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Editions Féret, Bordeaux, 207 p.

- Dudareva N., Pichersky N., Gershenzon J., 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135, 4, 1893-1902.
- Duplay J., Semhi K., Errais E., Imfeld G., Babcsanyi I., Perrone T., 2014. Copper, zinc lead and cadmium bioavailability and retention in vineyard soils (Rouffach, France): The impact of cultural practices. *Geoderma*, 230-231, 318-328.
- Eijsackers H., Beneke P., Maboeta M., Louw J. P. E., Reinecke A. J., 2005. The implications of copper fungicide usage in vineyards for earthworm activity and resulting sustainable soil quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 62, 99-111.
- El Azzi D., Viers J., Guiresse M., Probst A., Aubert D., Caparros J., Charles F., Guizien K., Probst J.L., 2013. Origin and fate of copper in a small Mediterranean vineyard catchment: New insights from combined chemical extraction and ^{65}Cu isotopic composition. *Science of the Total Environment*, 463-464, 91-101.
- Eleftheriou E. P., Karataglis S., 1989. Ultrastructural and morphological characteristics of cultivated wheat growing on copper polluted fields. *Botanica Acta*, 102, 134-140.
- El Hadri H., Chery P., Jalabert S., Lee A., Potin-Gautier M., Lespes G., 2012. Assessment of diffusive contamination of agricultural soil by copper in Aquitaine region by using French national Databases. *Science of the Total Environment*, 441, 239-247.
- E-phy, Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche. Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de cultures homologués en France. <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>.
- Ephytia, INRA. L'outil d'aide au diagnostic en santé des plantes pour identifier, connaitre et maitriser les maladies et ravageurs des cultures. <http://ephytia.inra.fr/>.
- Farrell M. et Jones D.L., 2010. Use of composts in the remediation of heavy metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 575-582.
- Fernandez-Calvino D., Novoa_Munoz J. C., Lopez-Pezperiago E., Arias-Estevez M., 2008. Changes in copper content and distribution in young old and abandoned vineyard acid soil due to land use changes. *Land Degradation & Development*, 19, 165-177.
- Fernandez-Calvino D., Arias-Estevez M., Diaz-Ravina M., Baath E., 2012. Assessing the effects of Cu and pH on microorganisms in highly acidic vineyard soils. *European Journal of Soil Science*, 63, 571-578.
- Ferreira R.B., Monteiro S., Freitas R., Santos C.N., Chen Z., Batista L.M., Duarte J., Borges A., Teixeira A.R., 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant. Pathol.*, 8, 677-700.
- Figueiredo A., Fortes A.M., Ferreira S., Sebastiana M., Choi Y.H., Sousa L., Acioli-Santos B., Pessoa F., Verpoorte R., Pais M.S., 2008. Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *J. Exp. Bot.*, 59, 3371-3381.
- Flores-Velez L.M., 1996. Essai de spéciation des métaux dans les sols : cas du Cu dans les vignobles. Thèse. Université Paris XII- Val de Marne, 131 p.
- Francis F., Haubruge E., Gaspar C., 2000. Influence of host plants on specialist :generalist aphids and on the development of *Adalia bipunctata* (Coleoptera : Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.*, 97, 481-485.

Funderburk J.S., Reitz P., Stansly S., Olson D., Sui G., McAvoy A., Whidden O., Demirozer G., Nuessly N., Leppa., 2011. Managing thrips in pepper and eggplant. University of Florida, IFAS Extension Publication, ENY 658, 11 pp.

Galet P., 1977. Les maladies et les parasites de la vigne. Editions techniques et Documentation, tome I, 872 p.

Géoportail, Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie. Le portail des territoires et des citoyens qui facilite l'accès à l'Information Géographique de Référence concernant l'ensemble du territoire national. <http://www.geoportail.gouv.fr/>.

Gessler C., Pertot I., Perazzolli M., 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, 3–44.

Gibson L.P., 1973. *An annotated list of the Cicadellidae and Fulgoridae of Elm*. Res. Pap. NE- 278. Upper Darby, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station. 8 pp.

Gindro K., Pezet R., Viret O., 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Biochem.*, 41, 846-853.

GIS Sol, 2011. L'état des sols de France. Groupement d'intérêt scientifique sur les sols, 188 p.

Glazebrook J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.

Gobbin D., Jermini M., Loskill B., Pertot I., Raynal M., Gessler C., 2005. The importance of *Plasmopara viticola* secondary inoculum to epidemics of grapevine downy mildew. *Plant Pathology*, 54, 522-534.

Gobbin D., Rumbou A., Linde C., Gessler C., 2006. Population genetic structure of *Plasmopara viticola* after 125 years of colonization in European vineyards. *Molecular Plant Pathology*, 7, 519-531.

Gobbin D., Bleyer G., Keil S., Kassemeyer H.H., Gessler C., 2007. Evidence for sporangial dispersal leading to a single infection event and a sudden high incidence of grapevine downy mildew. *Plant Pathology*, 56, 843-847.

Gols R., Bukovinszky T., Van Dam N.M., Bullock J.M., Harvey J.A., 2008. Performance of generalist and specialist herbivores and their endoparasitoids differs on cultivated and wild *Brassica* populations. *J. Chem. Ecol.*, 34, 132-143.

Graham R.D., 1981. Absorption of copper by plants roots. Copper in soils and plants. Ed Loneragan J.F., Robson A.D. and Graham R.D., Academic Press, 141-163.

Grenier J. et Asselin A., 1990. Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 3, 6, 401-407.

Grotz N., Guerinot M.L., 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 595-608.

Gruber B., Kosegarten H., 2002. Depressed growth of non-chlorotic vine grown in calcareous soil is an iron deficiency symptom prior to leaf chlorosis. *J. Plant Nutr. Soil. Sci.*, 165, 111-117.

- Grube M. et Kuntze H., 1988. Investigations about the availability of heavy-metals in soils with lithogen and anthropogen enrichment .1. Cd and Cu. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 151, 5, 319-324.
- Gubler W, Thind T, Feliciano A, Eskalen A, 2004. Pathogenicity of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 70–4.
- Hall, 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 366, 1-11.
- Hamiduzzaman M.M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J.M., Mauch-Mani B., 2005. β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 18, 819-829.
- Hardin M.R., Benrey B., Coll M., Lamp O., Roderick G.K., Barbosa P., 1995. Arthropod pest resurgence : an overview of potential mechanisms. *Crop Protection*, 14, 1, 3-18.
- Harmsen J., Rulkens W. et Eijsackers H., 2005. Bioavailability: concept for understanding or tool for prediciting? *Land Contamination & Reclamation*. 13, 161-171.
- Harter R. D. et Naidu R., 1995. Role of metal-organic complexation in metal sorption by soils. *Advances in Agronomy*. 55, 219-263.
- Hartvigsen G., Wait D.A., Coleman J.S., 1995. Tri-trophic interactions influenced by resource availability: predator effects on plant performance depend on plant resources. *Oikos*, 74, 463-468.
- Hatzidimitriou E., 1997. Recherches sur les conséquences œnologiques de la protection anti-cryptogamique de *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon. Faculté d'œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2.
- Haugen R., Steffes L., Wolf J., Brown P., Matzner S., Siemens D.H., 2007. Evolution of drought tolerance and defense : dependence of tradeoffs on mechanism, environment and defense switching. *Oikos*, 117, 231-244.
- Haynes R. J., 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil*, 126, 247-264.
- Hodge S., Powell G., 2008. Do plant viruses facilitate their aphid vectors by inducing symptoms that alter behavior and performance? *Environmental Entomology*, 37, 1573- 1581.
- Honda K., 1995. Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 30, 1-23.
- Hooks C.R.R. et Johnson. M.W., 2003. Impact of agricultural diversification on the insect community of cruciferous crops. *Crop Protection*, 22, 223-238.
- Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S., 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 6416-6421.
- Hough R. L., Tye A. M., Crout N. M. J., McGrath S. P. et Young S. D., 2005. Evaluating a 'Free Ion Activity Model' applied to metal uptake by *Lolium perenne* L. grown in contaminated soils. *Plant and Soil*. 270, 1-12.

- Huberty A.F. et Denno R.F., 2006. Consequences of nitrogen and phosphorus limitation for the performance of two planthoppers with divergent life-history strategies. *Oecologia*, 149, 444-455.
- Ingelmo F., Molina M.J., Soriano M.D., Gallardo A., Lapena L., 2012. Influence of organic matter transformations on the bioavailability of heavy metals in a sludge based compost. *Journal of Environmental Management*, 95, 5104-5109.
- Iwasaki K., Sakurai K., Takahashi E., 1990. Copper binding by the root cell walls of Italian ryegrass and red clover.-*Soil Science and Plant Nutrition*, 36, 431-439.
- Jack E., Hakvoort H.W.J., Reumer A., Verkleij J.A.C., Schat H., Ernst W.H.O., 2007. Real-time PCR analysis of metallothionein-2b expression in metalliocolous and non-metalliocolous populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Environ. Exp. Bot.*, 59, 84-91.
- Jacobson A.R., Dousset S., Guichard N., Baveye P.C., Andreux F., 2005. Diuron mobility through vineyard soils contaminated with copper. *Environ Pollut.*, 138, 250-9.
- Jailloux F., Willocquet L., Chapuis L., Froidefond G., 1999. Effect of weather factors on the release of ascospores of *Uncinula necator*, the cause of grape powdery mildew, in the Bordeaux region. *Can. J. Bot.*, 77, 1044-1051.
- Jervis M.A. et Heimpel G.E., 2005. *Phytophagy in insects as natural enemies*, Jervis M. A. Ed., Springer, Netherlands, 525-550.
- Jewell A.W., Murray B.G., Alloway J., 1988. Light and electron microscope studies on pollen development in barley (*Hodeum vulgare* L.) grown under copper-sufficient and deficient conditions. *Plant cell & Environment*, 11, 4, 273-281.
- Jones V.P. et Parrella M.P., 1984. The sublethal effects of selected insecticides on life table parameters of *Punonychus cifri* (Atari: Tetranychidae). *Curt. Entomol.*, 116, 1033-1040.
- Jones D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, 205, 25-44.
- Juang K.W., Lee Y.I., Lai H.Y., Wang C.H., Chen B.C. 2012. Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1315-1322.
- Jung C., Maeder V., Funk F., Frey B., Sticher H. and Frossard E., 2003. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant and Soil*, 252.
- Juniper B. et Southwood T.R.E., 1986. *Insects and the Plant Surface*. Edward Arnold, London, 360 p.
- Jürges G., Kassemeyer H.H., Durrenberger M., Duggelin M., Nick P., 2009. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopaa viticola* Berk. & Curt. De Bary depends on the host species. *Plant Biology*, 11, 886-898.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., 1992. *Trace elements in soils and plants*. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, 365p.
- Kabata Pendias A., 2010. *Trace elements in soils and plants*. 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, 432 p.
- Karley A.J., Douglas A.E., Parker W.E., 2002. Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *Journal of Experimental Biology*, 205, 19, 3009-3018.

- Kaspi R., Mossinso S., Drezner T., Kamensky B., Yuval B., 2002. Effects of larval diet on development rates and reproductive maturation of male and female Mediterranean fruit flies. *Physiological Entomology*, 27, 29-38.
- Kause A., Haukioja E., Hanhimaki S., 1999. Phenotypic plasticity in foraging behavior of sawfly larvae. *Ecology*, 80, 1230-1241
- Kelly C.K. et Hanley M.E., 2005. Juvenile growth and palatability in co-occurring, congeneric British herbs. *Am. J. Bot.*, 92, 1586-1589.
- Kennedy G.G. et Storer N.P., 2000. Life systems of polyphagous arthropod pests in temporally unstable cropping systems. *Annual Review of Entomology*, 45, 467-493.
- Kennelly M.M., Gadoury D.M., Wilcox W.F., Magarey P.A., Seem R.C., 2005. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Ecology and Epidemiology, Phytopathology*, 95, 12, 1445-1452.
- Kessler A. et Baldwin I.T., 2002. Plant responses to insect herbivory : the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Pathology*, 53, 299-328.
- Khan Z.R., Ampongnyarko K., Chiliswa P., Hassanali A., Kimani S., Lwande W., Overholt W.A., Pickett J.A., Smart L.E., Wadhams L.J., Woodcock C.M., 1997. Intercropping increases parasitism of pests. *Nature*, 388, 631-632.
- Kieffer F., Lherminier J., Simon-Plas F., Nicole M., Paynot M., Elmayan T., Blein J.P., 2000. The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *J. Exp. Bot.*, 51, 352, 1799-1811.
- Kim S.A., Guerinot M.L., 2007. Mining iron : Iron uptake and transport in plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581, 2273-2280.
- Kinniburgh D. G., Jackson M. L. et Syers J. K., 1976. Adsorption of alkaline earth, transition, and heavy metals cations by hydrous oxide gels of iron and aluminium. *Soil Science Society of America Journal*. 40, 796-799.
- Kinraide T.B., Pedler J.F., Parker D.R., 2004. Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in wheat induced by copper, zinc, aluminium, sodium and low pH. *Plant and Soil*, 259, 201-208.
- Ko B.G., Vogeler I., Bolan N.S., Clothier B., Green S., Kennedy J., 2007. Mobility of copper, chromium, arsenic from treated timber into grapevines. *Science of the Total Environment*, 388, 35-42.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A., Pineros M.A., 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Reviews in Plant Biology*, 55, 459-493.
- Komarek M., Szakova J., Rohoskova M., Javorska H., Chrastny V., Balik J., 2008. Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: a case study from the Czech Republic. *Geoderma*, 147, 16-22.
- Komarek M., Cadkova E., Chrastny V., Bordas F., Bollinger J.C., 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36, 138-151.
- Konno H., Nakato T., Nakashima S., Katoh K., 2005. *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin. *J. Exp. Bot.*, 56, 1923-1931.

- Kopittke P.M., Menzies N.W., 2006. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil*, 279, 287-296.
- Kopittke P.M., Asher C.J., Blamey F.P.C., Menzies N.W., 2007a. Toxic effects of Pb²⁺ on the growth and mineral nutrition of signal grass (*Brachiaria decumbens*) and Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Plant Soil*, 300, 127-136.
- Kopittke P.M., Asher C.J., Kopittke R.A., Menzies N.W., 2007b. Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Pollut.*, 150, 280-287.
- Kopittke P.M., Asher C.J., Blamey F.P.C., Menzies N.W., 2009. Toxic effects of Cu²⁺ on growth, nutrition, root morphology, and distribution of Cu in roots of Sabi grass. *Science of the Total Environment*. 407, 4616-4621.
- Kortekamp A. et Zyprian E., 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. 160, 1393-1400.
- Ksouri R., Gharsalli M., Lachaal M., 2004. Physiological responses of Tunisian grapevine varieties to bicarbonate-induced iron deficiency. *Journal of Plant Physiology*, 162, 335-341.
- Ksouri R., Gharsalli M., Lachaal M., 2005. Physiological responses of Tunisian grapevine varieties to bicarbonate-induced iron deficiency. *J. Plant Physiol.*, 162, 335-341.
- Ksouri R., Dobež A., Mahmoudi H., Ouerghi Z., Gharsalli M., Lachaal M., 2007. Genotypic variability with Tunisian grapevine varieties (*Vitis vinifera L.*) facing bicarbonate induced iron deficiency. *Plant Physiol. Biochem.*, 45, 312-322.
- Kursar T.A., Coley P.D., 2003. Convergence in defense syndromes of young leaves in tropical rainforests. *Biochem. Syst. Ecol.*, 21, 929-949.
- Laguerre G., Courde L., Nouaim R., Lamy I., Revellin C., Breuil M.C., Chaussod R., 2006. Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microbial Ecology*, 52, 426-435.
- Lai H.Y., Juang K.W., Chen B.C., 2010. Copper concentrations in grapevines and vineyard soils in central Taiwan. *Soil Science and Plant Nutrition*, 56, 601-606.
- Lanaras T., Moustakas M., Symeonidis L., Diamantoglou S., Karataglis S., 1993. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurement on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. *Physiol. Plant*, 88, 307-314.
- Lanno R., wells J., Conder J., Bradham K., Basta N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 39-47.
- Lapointe S.L., Weathersbee III A.A., Doostdar H., Richard T., Mayer R.T., 2004. Effect of Dietary Copper on Larval Development of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *The Florida Entomologist*, 87, 1, 25-29.
- Larignon P., Fontaine F., Farine S., Clement C., Bertsch C., 2009. Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences III-Vie* 333, 765-83.
- Larsen K.J., Listch A., Brewer, S.R., Taylor D.H., 1994. Contrasting effects of sewage sludge and commercial fertilizer on egg to adult development of two herbivorous insect species. *Ecotoxicology*, 3, 94-109.
- Larson R.L., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.

- Laveau C., Letouze A., Louvet G., Bastien S., Guerin-Dubrana L., 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathol. Mediterr.*, 48, 32-46.
- Lecomte P., Darrieutort G., Defives A., Louvet G., Limanana J.M., Blancard D., 2006. Observations of black dead arm symptoms in Bordeaux vineyards: evolution of foliar symptoms, localisation of longitudinal necroses, questions, hypotheses. IOBC/WPRS Bulletin 29, Working Group “Integrated Protection in Viticulture”, Proceedings of a Meeting at Boario Terme, Italy, 20-22 October 2005, 93-4.
- Lecomte F., Abro M.A., Nicot P.C., 2010. Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathology*, 59, 891-899.
- Lecomte P., Darrieutort G., Limanana J.M., Comont G., Muruamendiaraz A., Legorburu F.J., Choueiri E., Jreijiri F., El Amil R., Fermaud M., 2012. New insights into Esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease*, 96, 7, 924-934.
- Lee J.C., Heimpel G.E., 2008. Floral resources impact longevity and oviposition rate of a parasitoid in the field. *J. Anim. Ecol.*, 77, 3, 565-572.
- Lejon D. P. H., Martins J. M. F., Leveque J., Spadini L., Pascault N., Landry D., Milloux M. J., Nowak V., Chaussod R., Ranjard L., 2008. Copper dynamics and impact on microbial communities in soils of variable organic status. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 2819-2825.
- Lessio F. et Alma A., 2004. Dispersal patterns and chromatic response of *Scaphoideus titanus* ball (Homoptera Cicadellidae), vector of the phytoplasma agent of grapevine flavescence doree. *Agricultural and Forest Entomology*, 6, 121-127.
- Letourneau D.K., jedlicka J.A., Boyhowell S.G., Moreno C.R., 2009. Effects of natural enemy biodiversity on the suppression of arthropod herbivores in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 40, 573-592.
- Le vin pas à pas, Yann Rousselin. La methode simple pour apprendre le vin. <http://www.le-vin-pas-a-pas.com/apprenez-a-localiser-les-vins-du-monde/>
- Lexmond T.M., Van der Vorm P.D.J., 1981. The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 29, 217-238.
- Li R., 1994. Effect of long-term applications of copper on soil and grape copper (*Vitis vinifera*). *Can. J. Soil. Sci.*, 74, 345-347.
- Li M.S., Luo Y.P., Su Z.Y., 2007. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environmental Pollution*, 147, 168-175.
- Lidon F. C. et Henriques F. S., 1992. Effects of increasing concentrations of Cu on metal uptake kinetics and biomass yields. *Soil Science*, 154, 44-49.
- Lieutier F., Giordanengo P., Dugravot S., Cortesero A.M., 2013. Défenses induites. Interactions insectes-plantes, partie 5. Eds Sauvion N., Calatayud P.A., Thiéry D., Marion-Poll F., IRD/Quae/ publ., 407-422.
- Lindqvist L., 1992. Accumulation of cadmium, copper and zinc in 5 species of phytophagous insects. *Environmental Entomology*, 21, 1, 160-163.
- Lindsay W.L., 1979. Chemical equilibria in soils. John Wiley and Sons. 449 p.

- Linehan W.L., 1984. Micronutrient cation sorption by roots and uptake by plants. *Journal of Experimental Botany*, 35, 1571-1574.
- Liu G., Greenshields D.L., Sammynaiken R., Hirji R.N., Selvaraj G., Wei Y., 2007. Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of Cell Science*, 120, 4, 596-605.
- Llorens N., Arola L., Blade C., Mas, A., 2000. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. *Plant Sci.*, 160, 159-163.
- Loneragan J.F., 1981. Distribution and movement of copper in plants. *Copper in soils and plants*. Ed Loneragan J.F., Robson A.D. and Graham R.D., Academic Press, 165-187.
- Loué A. 1993. Oligoéléments en agriculture. Ed. Nathan, 577 p.
- Lou L.Q., Shen Z.G., Li X.D., 2004. The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis*, a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany*, 51, 111-120.
- Loué A. 1993. Oligoéléments en agriculture. Ed. Nathan, 577 p.
- Luna C.M., Gonzalez C.A., Trippi V.S., 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell. Physiol.*, 35, 11-15.
- Ma Y. B., Lombi E., Oliver I. W., Nolan A. L. and McLaughlin M. J., 2006. Long-term aging of copper added to soils. *Environmental Science & Technology*. 40, 6310-6317.
- Mackie K.A., Muller T., Kandeler E., 2012. Remediation of copper in vineyards – A mini review. *Environmental Pollution*, 167, 16-26.
- Maher N., 2002. Selection du site de ponte chez *Lobesia botrana* (Lepidoptera, Tortricidae) : Influence de l'information chimique non-volatile présente sur les fruits des plantes hôtes. *Université Bordeaux 2*, 204 p.
- Marcellin H., 1974 La vigne dans les sols acides du Roussillon. *Progrès agricole et viticole*, 17, 548-555.
- Marchalsegault D., Briancon C., Halpern S., Fragu P., Lauge G., 1990. Secondary ion mass-spectrometry analysis of the copper distribution in *Drosophila melanogaster* chronically intoxicated with bordeaux mixture. *Biology of the cell*, 70, 3, 129-132.
- Marrs K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 47, 127-58.
- Marschner H., 1995. Mineral nutrition of higher plants. Second Edition, Academic Press, 889 p.
- Marschner, H., 2003. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Martins V., Hanana M., Blumwald E., Geros H., 2012. Copper transport and compartmentation in grape cells. *Plant and cell physiology*, 53, 11, 1866-1880.
- Martins V. Teixeira A., Bassil E., Blumwald E., Geros H., 2014a. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant physiology and Biogeochemistry*, 82, 270-278.
- Martos S., Andolfi A., Luque J., Mugnai L., Surico G., Evidente A., 2008. Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology* 121, 451–61.

- Mayer C.J., Vilcinskis A., Gross J., 2008. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. *J. Chem. Ecol.*, 34, 1518-1522.
- Mazzoni V., Prešern J., Lucchi A., Virant-Doberlet M., 2009. Reproductive strategy of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). *Bulletin of Entomological Research*, 99, 401-413.
- McBride M.B., 1981. Forms and distribution of copper in solid and solution phases of soil. *Copper in soils and plants*. Ed Loneragan J.F., Robson A.D. and Graham R.D., Academic Press, 25-45.
- McBride M.B., 1989. Reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Science*, 10, 1-56.
- McBride M.B., 2001. Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *Journal of Environmental Quality*, 30, 78-84.
- McCoy R.E., Caudwell A., Chang C.J., Chen T.A., Chiykowski L.N., Cousin M.T., Dale J.L., de Leeuw G.T.N., Golino D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwitz R., Petzold H., Sinha R.C., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M., Seemuller E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. *The Mycoplasmas*. Whitcomb R.F. and Tully J.G. eds, 545-640.
- McKenzie R. M., 1980. The adsorption of lead and other heavy metals on oxides of manganese and iron. *Australian Journal of Soil Research*. 18, 61-73.
- Meggio F., Prinsi B., Negri A.S., Simone Di Lorenzo G., Lucchini G., Pitacco A., Failla O., Scienza A., Cocucci M., Espen L., 2014. Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 310-323.
- Mellersh D.G. et Heath M.C., 2001. Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *The plant Cell*, 13, 413-424.
- Mellersh D.G., Foulds I.V., Higgins V.J., Heath M.C., 2002. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions. *Plant J.*, 29, 257-268.
- Melzer R.R. et Berton O., 1986. Incidence of *Botryosphaeria berengeria* on apple (*Malus domestica*) in the State of Santa Catarina, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 11, 4, 891-898.
- Mengel K., Kirkby E.A., 2001. Soil copper. *Principles of plant nutrition.*, 5th ed, Kluwer Academic Publishers, 599-611.
- Michaud A.M., Bravin M.N., Galleguillos M., Hinsinger P., 2007. Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil*, 298, 99-111.
- Migeon A., Blaudez D., Wilkins O., Montanini B., Campbell M.M., Richaud P., Thomine S., Chalot M., 2010. Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67, 3763-378.
- Miller J.R. et Strickler K.S., 1984. Finding and accepting host plants. *Chemical Ecology of Insects*, Bell W.J., Carde R.T., Chapman & Hall, London.
- Miotto A., Ceretta C.A., Brunetto G., Nicoloso F.T., Girotto E., Farias J.G., Tiecher T.L., De Conti L., Trentin G., 2014. Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. *Plant and Soil*, 374, 593-610.

- Mirlean N., Roisenberg A., Chies J.O., 2007. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environmental Pollution* 149, 10-17.
- Mohammadi H., Gramaje D., Banihashemi Z., 2013. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* Associated with Grapevine Decline in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 3, 603-616.
- Moller W.J. et Kasimatis A.N., 1978. Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniaca*. *Plant Disease Report*, 62, 245-58.
- Molot B., 2003. Réduction des apports cupriques en viticulture biologique : étude du lessivage foliaire sous simulateur de pluie. Dossier technique de l'Institut Technique de la Vigne et du Vin.
- Mooney H.A., Gulmon S.L., 1982. Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. *BioScience*, 32, 198-206.
- Moreau J., Thiéry D., Troussard J.P., Benrey B., 2007. Grape variety affects female but also male reproductive success in wild European grapevine moths. *Ecological Entomology*, 32, 747-753.
- Moreau J et ThiéryD., 2013. Qualité de la plante hôte et succès reproducteur. Interactions insectes-plantes, partie 4. Eds Sauvion N., Calatayud P.A., Thiéry D., Marion-Poll F., IRD/Quae/ publ., 369-382.
- Moreira F.M., Madini A., Marino R., Zulini L., Stefanini M., Velasco R., Kozma P., Grando M.S., 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis spp.*) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes*, 7, 1, 153-167.
- Morgan R.K., Taylor E., 2004. Copper Accumulation in Vineyard Soils in New Zealand. *Environmental Sciences*, 1, 2, 139-167.
- Morinaga K., Imai S., Yakushiji H., Koshita Y., 2003. Effects of fruit load on partitioning of ^{15}N and ^{13}C , respiration, and growth of grapevine roots at different fruit stages. *Scientia Horticulturae*, 97, 239-253.
- Müller-Thurgau H., 1911. Infektion der Weinrebe durch *Plasmopara viticola*. *Zentralbl. Bakteriol.*, II, 69, 683-695.
- Nakayama T., Yonekura-Sakakibara K., Kikuchi S., Fukui Y., Fukuchi-Mizutani M., Ueda T., Nakao M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T., 2000. Aureusidin Synthase : A polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science*, 290, 1163-1166.
- Ngumbi E., Eigenbrode S.D., Bosque-Perez N.A., Ding H., Rodriguez A., 2007. *Myzus persicae* is arrested more by blends than by individual compounds elevated in headspace of PLRV-Infected potato. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1733-1747.
- Nyoike T.W. et Liburd. O.E., 2010. Effect of living (buckwheat) and UV reflective mulches with and without imidacloprid on whiteflies, aphids and marketable yields of zucchini squash. *International Journal of Pest Management*, 56, 31-39.
- Ollat N., Laborde B., Neveux M., Diakou-Verdin P., Renaud C., Moing A., 2003. Organic acid metabolism in roots of various grapevine (*Vitis*) rootstocks submitted to iron deficiency and bicarbonate nutrition. *J. Plant Nutr.*, 26, 2165-2176.
- Osti F. et Di Marco S., 2010. Iron-dependent, non-enzymatic processes promoted by *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*, agents of esca in grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 309-316.

- Ouzounidou G., Eleftheriou E.P., Karataglis S., 1992. Ecophysiological and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (cruciferae). *Can. J. Bot.*, 70, 947-957.
- Owojori O.J., Reinecke A.J., 2010. Effects of natural (flooding and drought) and anthropogenic (copper and salinity) stressors on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* under field conditions. *Applied Soil Ecology*, 44, 156-163.
- Patakas A. et Noitsakis B., 2001. Leaf age effects on solute accumulation in water-stressed grapevines. *J. Plant. Physiol.*, 158,63-69.
- Panou-Filotheou, Bosabalidis A.M., 2004 Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*). *Plant science*, 166, 1497-1504.
- Paoletti M.G, Sommaggio D., Favretto M.R., Petruzzelli G., Pezzarossa B., Barbafieri M. 1998. Earthworms as useful bioindicators of agroecosystem sustainability in orchards and vineyards with different inputs. *Applied Soil Ecology*, 10, 137-150.
- Papura D., Delmotte F., Giresse X., Salar P., Danet J.L., Van Helden M., Foissac X., Malembic-Maher S., 2009. Comparing the spatial genetic structures of the Flavescence doree phytoplasma and its leafhopper vector *Scaphoideus titanus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 867-876.
- Papura D., Burban C., van Helden M., Giresse X., Nusillard B., Guillemaud T., Kerdelhué C., 2012. Microsatellite and mitochondrial data provide evidence for a single major introduction for the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* in Europe. *PLoS ONE*, 7, e36882.
- Parat C., Chaussod R., Leveque J., Dousset S., Andreux F., 2002. the relationship between copper accumulated in vineyard calcareoussoils ans soil organic matter and iron. *European Journal of Soil Science*, déc. 2002, 53, 663-669.
- Pasquier G., 2012. Etude de l'impact de l'Esca sur la qualité des raisins par une approche protéomique. *Université Bordeaux 2*, 340 p.
- Pastenes C., Villalobos L., Rios N., Reyes F., Turgeon R. ? Franck N., 2014. Carbon partitioning to berries in water stressed grapevines : The role of active transport in leaves and fruits. *Environmental and Experimental Botany*, 107, 154-166.
- Peeters P.J., 2002. Correlations between leaf structural traits and the densities of herbivorous insect guilds. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77, 43-65.
- Pertot I., Gobbin D., Gessler C., 2003. Occurrence of *Plasmopara viticola* primary and secondary infections in the early stage of the season in Northern Italy (Trentino). *Bulletin OILB/SROP*, 26, 8, 47-50.
- Petit A.N., Wojnarowicz G., Panon M.L., Baillieul F., Clement C., Fontaine F., Vaillat-Gaveau N., 2009. Botryticides affect grapevine leaf photosynthesis without inducing defenses mechanisms. *Planta*, 229, 497-506.
- Pezet R., Gindro K., Viret O., Spring, J.L., 2004. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 65, 297-303.
- Picaud F., Bonnet E., Gloaguen V., Petit D., 2003. Decision making for food choice by grasshoppers (Orthoptera: Acrididae): Comparison between a specialist species on a shrubby legume and three graminivorous species. *Environmental Entomology*, 32, 680-688.

- Picoaga A., Cartea M.E., Soengas P., Monetti L., Ordás A., 2003. Resistance of kale populations to lepidopterous pests in north-western Spain. *Journal of Economic Entomology*, 96, 143-147.
- Pietrzak U., McPhail D.C., 2004. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, 122, 151-166.
- Pineros M.A., Magalhaes J.V., Alves V.M.C., Kochian L.V., 2002. The physiology and biophysics of an aluminium tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiology*, 129, 1194-1206.
- Pitt W.M., Huang R., Steel C.C., Savocchia S., 2013. Pathogenicity and epidemiology of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevines in Australia. *Australia Plant Pathology*, 42, 5, 573-582.
- Poelman E.H., Galiart R.J.H.F, Raaijmakers C.E., Van Loon J.J.A., Van Dam N.M., 2008. Performance of specialist and generalist herbivores feeding on cabbage cultivars is not explained by glucosinolate profiles. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, 127, 218-228.
- Poschenrieder C., Bech J., Llugany M., Pace A., Fenes E., Barcelo J., 2001. Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant and Soil*, 230, 247-256.
- Poschenrieder C., Tolra R., Barcelo J., 2006. Can metals defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.*, 11, 288-295.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A., Stewart C.R., 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in Maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell Online*, 6, 65-74.
- Probst B., Schuler C., Joergensen R.G., 2008. Vineyard soils under organic and conventional management – microbial biomass and activity indices and their relation to soil chemical properties. *Biol. Fertil Soils*, 44, 443-450.
- Prokopy R.J., et Owens E.D., 1983. Visual detection of plants by herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 28, 337-364.
- Provenzano M.R., Bilali H.E., Simeone V., Baser N., Mondelli D., Cesari G., 2010. Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chemistry*, 122, 1338-1343.
- Puig S., Andres-Colas N., Garcia-Molina A., Penarrubia L., 2007. Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: response to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell and Environment*, 30, 271-290.
- Punithalingam E. et Holliday P., 1973. *Botryosphaeria ribis*. CMI Descriptions of Funga and Bacteria, 395.
- Quartacci M.F., Pinzino C., Sgherri C.L.M., Dalla Vecchia F., Navari-Izzo F., 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiologia Plantarum*, 108, 87-93.
- Ranjard L., Lignier L., Chaussod R., 2006. Cumulative effects of short-term polymetal contamination on soil bacterial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1684-1687.
- Ratnadass A. et Deguine J.P., 2013. Plantes cultivées versus plantes sauvages. Interactions insectes-plantes, partie 2. Eds Sauvion N., Calatayud P.A., Thiéry D., Marion-Poll F., IRD/Quae/ publ., 183-196.

Règlement CE 889/2008 de la Commission du 5 septembre 2008 portant modalités d'application du règlement (CE) no 834/2007 du Conseil relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques en ce qui concerne la production biologique, l'étiquetage et les contrôles. Journal Officiel des Communautés européennes du 18 septembre 2008.

Regourd D., 2000. Incidences du type de sol et des pratiques culturales sur des paramètres de qualité biologique des sols viticoles du Frontonnais. Compte rendu ITV, 18 p.

Renwick J.A. et Huang X., 1994. Interacting Chemical Stimuli Mediating Oviposition by Lepidoptera. Functional Dynamics of Phytophagous Insects, T. N. Ananthakrishnan ed., New Delhi Bombay Calcutta: Oxford & IBH publishing Co. PVT, Ltd.

Reuter D. J., Robinson J. B., 1997. Plant analysis: an interpretation manual. CSIRO publishing, Australia, 572 p.

R'Houma A., Chérif M., Boubaker A. 1998. Effect of nitrogen fertilizing, green pruning and fungicide treatments on Botrytis bunch rot of grapes. Journal of Plant Pathology, 80, 115-24.

Riolo P., Minuz R.L., Landi L., Nardi S., Ricci E., Righi M., Isidoro N., 2014. Population dynamics and dispersal of *Scaphoideus titanus* from recently recorded infested areas in central-eastern Italy. Bulletin of Insectology, 67, 1, 99-107.

Robert M., 1995. Différents types de transfert du sol vers les hydrosystèmes : dissous ou particulaire, latéral ou vertical. Actes des sixièmes journées du DEA Sciences et techniques de l'Environnement : Transfers des polluants dans les hydrosystèmes, paris, 13-26.

Rogiers S.Y., Hardie W.J., Smith J.P., 2011. Stomatal density of grapevine leaves (*Vitis vinifera* L.) responds to soil temperature and atmospheric carbon dioxide. Australian Journal of Grape and Wine Research, 17, 147-152.

Romeu-Moreno A., Mas A. 1999. Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 2519-2522.

Römheld V. et Marschner H., 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. Adv. Plant Nutr., 2,155–204.

Romić M., Romić D., Dolanjski D., Stričević I., 2004. Heavy metal accumulation in topsoils from the wine-growing regions. Part 1. Factors which control retention. Agric Conspec Sci., 69, 1–10.

Ronn R., Gavito M., Larsen J., Jakobsen I., Frederiksen H., Christensen S., 2002. Response of free-living soil protozoa and microorganisms to elevated atmospheric CO₂ and presence of mycorrhiza. Soil Biology and Biochemistry, 34, 923-932.

Rossini Oliva S., Mingorance M.D., Valdes B., Leidi E.O., 2009. Uptake, localisation and physiological changes in response to copper excess in *Erica andevalensis*. Plant Soil, 328, 411-420.

Rouphael Y. Cardarelli M., Rea E., Colla G., 2008. Grafting of cucumber as a means to minimize copper toxicity. Environmental and Experimental Botany, 63, 49-58.

Rousseau J., 1995. Utilisation du cuivre en agriculture biologique. Impact sur l'environnement et perspectives de diminution des doses employées. Institut Technique de l'Agriculture Biologique, Paris, 62pp.

Rouxel M., 2012. Ecologie et évolution de l'interaction *Plasmopara viticola/Vitis* spp. Et évaluation des risques de contournement de la résistance de la vigne au mildiou. Université Bordeaux-Segalen, 186 p.

- Rouxel M., Mestre P., Comont G., Lehman B.L., Schilder A., Delmotte F., 2013. Phylogenetic and experimental evidence for host-specialized cryptic species in a biotrophic oomycete. *New Phytologist*, 197, 1, 251-263.
- Rusjan D., Strlic M., Pucko D., Korošec-Koruza Z., 2007. Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. *Geoderma*, 141, 1-2, 111-118.
- Ryan P.R., Delhaize E., Jones D.L., 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52, 527-560
- Sakalidis M.L., Slippers B., Wingfield B.D., Hardy G.E.St.J., Burgess T.I., 2012. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum-N. ribis* species complex. *Diversity and Distributions*, 19, 873-883.
- Salar P., Charenton C., Foissac X., Malembic-Maher S., 2012. Multiplication kinetics of Flavescence Dorée phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. *Eur. J. Pathol.*, 135, 371-381.
- Salim M., Saxena R.C., 1991. Nutritional stresses and varietal resistance in rice – effects on whitebacked planthopper. *Crop Science*, 31, 3, 797-805.
- Salvatore M.D., Carratu G., Carafa A.M., 2009. Assessment of heavy metals transfer from a moderately polluted soil into the edible parts of vegetables. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7, 2, 683-688.
- Sasaki T. et Ishikawa H., 1995. Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 41, 41-46.
- Sauve S., Mc Bride M.B., Norvell W.A., Hendershot W.H., 1997. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level; pH and organic matter. *Water, Air and Soil Pollution*, 100, 133-149.
- Sauve S., Mc Bride M.B., Hendershot W.H., 1998. Derivation of soil quality criteria using predicted chemical speciation of Pb²⁺ and Cu²⁺. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 1481-1489.
- Schaller A., 2008. Induced plant resistance to herbivory. Springer, Ed Schaller A., University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 460p.
- Schat H., Sharma S.S., Vooijs R., 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia plantarum* 101, 477-82.
- Scheffer K., Stach W., Vardakis F., 1979. Über die verteilung der schwermetallen eisen. Manga, Kupfer und Zink in Sommergesternpflanzen, *Landwirtsch. Forsch.*, 2, 326.
- Scholl W., Enkelmann R., 1984. The copper content of vineyard soils. *Landwirtsch. Forschung*, 37, 286-297.
- Schoonhoven L.M., Jermy T., van Loon J.J.A., 1998. *Insect-Plant Biology*. Chapman & Hall, London, 409 p.
- Schvester D., 1962. Sur les causes de la propagation en Armagnac et en Chalosse de la Flavescence dorée de la vigne. *Revue de Zoologie Agricole et Appliquée*, 10-12, 132- 135.

- Sheldon A.R., Menzies N.W., 2005. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant Soil*, 278, 341-349.
- Shen L., Foster J.G., Orcutt D.M., 1989. Composition and distribution of free amino acids in Flatpea (*Lathyrus sylvestris* L.) as influenced by water deficit and plant ge. *Journal of experimental botany*, 40, 71-79.
- Singer M.S., Carriere Y., Theuring C., Hartmann T., 2004. Disentangling food quality from resistance against parasitoids : diet choice by a generalist caterpillar. *The american naturalist*, 164, 423-429.
- Sivipalan P., et Gnanapragasam N.C., 1980. Influence of copper on the development and adult emergence of *Homona Coffearia* (Lepidoptera : Tortricidae) reared in vitro. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 28, 59-63.
- Smith C.R., Knowles V.L., Plaxton W.C., 2000. Purification and characterization of cytosolic pyruvate kinase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cultures. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4477-4485.
- Smith A.H. et Liburd O.E., 2012. Intercropping, crop diversity and pest management. University of Florida, IFAS Extension, ENY862, 1-7.
- Snyman R.G., Reinecke A.E.A.J., Reinecke A.E.S.A., 2009. Quantitative changes in digestive gland cells and oocytes of *Helix aspersa*, as biomarkers of copper oxychloride exposure under field conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 83, 19-22.
- Spagnolo A., Magnin-Robert M., Alayi D., Cilindre C., Schaeffer-Reiss C., Van Dorsselaer A., Clement C., Larignon P., Ramirez-Suero M., Chong J., Bertsch C., Abou-Mansour Z., Fontaine F., 2014. Differential responses of three grapevines cultivars to *Botryosphaeria* Dieback. *Biochemistry and Cell biology*, 104, 10, 1021-1035.
- Sposito G., 1989. *The chemistry of soils*. Oxford University Press, New York.
- Städler E., 2002. Plant chemical cues important for egg deposition by herbivorous insects. *Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition*, ed. M Hilker, T Meiners, Berlin, Blackwell Sci. , 171-204.
- Stamp N., 2003. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *Quarterly Review of Biology*, 78, 23-55.
- Steffek R., Reizenzein H., Zeisner N., 2007. Analysis of the pest risk from Grapevine flavescence dorée phytoplasma to Austrian viticulture. *EPPPO Bulletin*, 37, 191-203.
- Stevenson F. J., 1994. *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*. Wiley, New York. 512 p.
- Teder T. et Tammaru T., 2002. Cascading effects of variation in plant vigour on the relative performance of insect herbivores and their parasitoids. *Ecological Entomology*, 27, 94-104.
- Thiéry D., Brevault T., Quilici S., Dormont L., Schatz B., 2013a. Recherche de la plante hôte à distance. *Interactions insectes-plantes, partie 4*. Eds Sauvion N., Calatayud P.A., Thiéry D., Marion-Poll F., IRD/Quae/ publ., 319-346.
- Thiéry D., Derridj S., Calatayud P.A., Maher N., Marion-Poll F., 2013b. L'insecte au contact des plantes. *Interactions insectes-plantes, partie 4*. Eds Sauvion N., Calatayud P.A., Thiéry D., Marion-Poll F., IRD/Quae/ publ., 347-368.

- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.*, 11, 1187-1194.
- Thornton I., 1999. Bioavailability of trace metals in the foodchain. *In* 5 international Conference on the Biogeochemistry of trace elements, Eds W. W. Wenzel, D. C. Adriano, B. J. Alloway, H. E. Doner, C. Keller, N. W. Lepp, M. Mench, R. Naidu and G. M. Pierzynski. pp XI-XIV, Vienna, Austria.
- Tiller K.G., Merry H., 1981. Copper pollution of agricultural soils. Copper in soils and plants, Ed. Loneragan J.F., Robson A.D. and Graham R.D., Academic Press, 25-45.
- Todd J.L., Phelan P.L., Nault L.R., 1990. Interaction between visual and olfactory stimuli during host-finding by leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16, 2121-2133.
- Toselli M., Baldi E., Marcolini G., Malaguti D., Quartieri I.M., Sorrentini G., Marangoni B., 2008. Response of potted grapevines to increasing soil copper concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 85-92.
- Truman W., Bennett M.H., Kubigsteltig I., Turnbull C., Grant M., 2007. Arabidopsis systemic immunity uses conserved defence signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 104, 1075-1080.
- Turlings T.J.C. et Wackers F., 2004. Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Advances in Insect Chemical Ecology*, Carde R.T., Millar J.G., Cambridge University Press, Cambridge.
- Tyler G., Olsson T., 2001. Concentrations of 60 elements in the soil solution as related to the soil acidity. *European Journal of Soil Science*, 52, 151-165.
- Urbez-Torres J.R., Gubler W.D., Luque J., 2007. First report of *Botryosphaeria iberica* and *Botryosphaeria viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease*, 91, 772.
- Urbez-Torres J.R., Bruez E., Hurtado J., Gubler W.D., 2010. Effects of Temperature on Conidial Germination of Botryosphaeriaceae Species infecting Grapevines. *Plant Disease*, 94, 12, 1476-1484.
- Vaissayre M., Goebel F.R., Giordanengo P., Lieutier F., 2013. Défenses constitutives. Interactions insectes-plantes, partie 5. Eds Sauvion N., Calatayud P.A., Thiéry D., Marion-Poll F., IRD/Quae/ publ., 393-406.
- Valtaud C., Foyer C.H., Fleurat-Lessard P., Bourbouloux A., 2009. Systemic effects on leaf glutathione metabolism and defence protein expression caused by esca infection in grapevines. *Functional Plant Biology*, 36, 260-79.
- Van Hullebusch E., Chatenet P., Deluchat V., Chazal P.M., Froissard D., Botineau M., Ghestem A., Baudu M., 2003. Copper accumulation in a reservoir ecosystem following copper surface treatment. *Water, Air and Soil Pollution*, 150, 3-22.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-62.
- Van Niekerk J.M., Crous P.W., Gronewald J.Z., Fourie P., Halleen F., 2004. DNA phylogeny, morphology, and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-98.

- Van Niekerk J.M., Strever A.E., du Toit P. G., Halleen F., Fourie P.H., 2011. Influence of water stress on Botryosphaeriaceae disease expression in grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, S, 151-165.
- Vannozzi A., Dry I., Fasoli M., Zenoni S., Lucchin M., 2012. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biol.*, 12, 130-151.
- Van Zwieten L., Rust J., Kingston T., Merrington G., Morris S., 2004. Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soils. *Sci Total Environ.*, 329, 29–41.
- Villanneau E., Perry-Giraud C., Saby N., Jolivet C., Marot F., Maton D., Floch-Barneaud A., Antoni V., Arrouays D., 2008. Détection de valeurs anormales d'éléments traces métalliques dans les sols à l'aide du Réseau de Mesure de la Qualité des Sols. *Etude et Gestion des Sols*, 15, 3, 183-200.
- Visser J.H., 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 31, 121-144.
- Vitanovic E., Vidacek Z., Kacic S., Katalinic M., 2008. Contamination of Kastela Bay vineyard soils with heavy metals. *Agronomski Glasnik*, 3, 237-246.
- Viti C., Quaranta D., De Philippis R., Corti G., Agnelli A., Cuniglio R., Giovannetti L., 2008. Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide-amended olive orchard and vineyard soils. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 309-318.
- Von Wiren N., Romheld V., Shioiri T., Marschner H., 1995. Competition between microorganisms and roots of barley and sorghum for iron accumulated in the root apoplast. *New Phytologist*, 130, 511-521.
- Vulkan R., Zhao F.J., Barbosa-Jefferson V., Preston S., Paton G.I., McGrath S.P., 2000. Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environmental Science and Technology*, 34, 5115-5121.
- Vystavna Y., Rushenko L., Diadin D., Klymenko O., Klymenko M., 2014. Trace metals in wine and vineyard environment in southern Ukraine. *Food Chemistry*, 146, 339-344.
- Wakelin S., Gerard E., Black A., Hamonts K., Condrón L., Yuan T., Van Nostrand J., Zhou J., O'Callaghan M., 2014. Mechanisms of pollution induced community tolerance in a soil microbial community exposed to Cu. *Environmental Pollution*, 190, 1-9.
- Wallis C., Eyles A., Chorbadjian R.A., Riedl K., Schwartz S., Hansen R., Cipollini D., Herms D.A., Bonello P., 2009. Differential effects of nutrient availability on the secondary metabolism of Austrian pine (*Pinus nigra*) phloem and resistance to *Diplodia pinea*. *Forest Pathology*, 41, 52-58.
- Walter A.J., DiFonzo C.D., 2007. Soil potassium deficiency affects soybean phloem nitrogen and soybean aphid populations. *Environ. Entomol.*, 36, 26-33.
- Wang Q.Y., Zhou D.M., Cang L., 2009. Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1504–1509.
- Wei L., Luo C., Li X., Shen Z., 2008. Copper accumulation and tolerance in *Chrysanthemum coronarium* L. and *Sorghum sudanense* L. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 55, 238-246.

- Weintraub P.G. et Beanland L.A., 2005. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 91-111.
- Wheeler D.M., Power I.L., 1995. Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. *Plant and Soil* 172,163-173.
- Wightwick A.M., Mollah M.R., Partington D.L., Allinson G., 2008. Copper Fungicide Residues in Australian Vineyard Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2457–2464.
- Wilkinson T.L., Douglas A.E., 2003. Phloem amino acids and the host plant range of the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 106, 103- 113.
- Wong F.P., Burr H.N., Wilcox W.F., 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 50, 4, 427-432.
- Xie W., Zhou J., Wang H., Chen X., Lu Z., Yu J., Chen X., 2009. Short-term effects of copper, cadmium and cypermethrin on deshydrogenase activity and microbial functional diversity in soils after long-term mineral or organic fertilization. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 129, 450-456.
- Xuan Y., Scheuermann E.B., Meda A.R., Hayen H., Von Wiren N., Weber G., 2006. Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1136, 73-81.
- Xue H., Nhat P.H., Gächter R., Hooda P.S., 2003. The transport of Cu and Zn from agricultural soils to surface water in a small catchment. *Advances in Environmental Research*, 8, 69-76.
- Yang H.Y. et Chen C.W., 2009. Extracellular and intracellular polyphenol oxidases cause opposite effects on sensitivity of *Streptomyces* to phenolics : A case of double-edged sword. *PlosOne*, 4, 10, e7462, 1-10.
- Yobouet Y.A., Adouby K., Trokourey A. et Yao B., 2010. Cadmium, copper, lead and zinc speciation in contaminated soils. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2, 5, 802-812.
- Yruela I., Pueyo J.J., Alonso P.J., Picorel R., 1996. Photoinhibition of photosystem II from higher plants – effect of copper inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 27408-27415.
- Yruela I., 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-156.
- Zecca G., Abbott J.R., Sun W.B., Spada A., Sala F., Grassi F., 2012. The timing and the mode of evolution of wild grapes (*vitis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 2, 736-747.
- Zhang H., Zhao F.J., Sun B., Davison W., McGrath S.P., 2001 A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 2602-2607.
- Zhao F.J., Rooney C.P., Zhang H., McGrath S.P., 2006. Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 733-742.

ANNEXES

Questionnaire INRA

Nom du domaine :

Adresse :

Nom du chef de culture :

Coordonnées téléphoniques :

Mail :

**Merci d'entourer la bonne réponse*

1. Description du sol

1.1. Disposez-vous d'analyses du sol* ? oui - non

Si oui, acceptez-vous de nous les communiquer* ? oui - non

1.2. Quels types de sol sont présents sur le domaine ?

Merci d'apporter les analyses du sol si elles existent à la réunion

2. Pratique de l'enherbement

2.1. Pratiquez-vous l'enherbement sur vos parcelles* ? oui - non

Si oui, s'agit-il d'un enherbement total, dans l'inter-rang, 1 rang sur 2, 1 rang sur 3* ?

S'agit-il d'un enherbement naturel ou artificiel* ?

2.2. Pratiquez-vous le désherbage chimique ou mécanique* ?

3. Fertilisation

3.1. Faites-vous un apport d'amendements organiques sur les parcelles* ? oui - non

Si oui, quel type d'amendements et à quelle fréquence ? :

3.2. Faites-vous un apport d'engrais minéraux ou organiques sur les parcelles* ? oui - non

Si oui, quel type d'engrais et à quelle fréquence ?

3.3. Pratiquez-vous le chaulage sur les parcelles* ? oui - non

Si oui, à quelle dose et à quelle fréquence ?

4. Traitements cupriques

4.1. Effectuez-vous toujours des traitements cupriques sur les parcelles* ? oui - non

Si oui, merci de remplir le tableau suivant :

Matière active	Dose à l'hectare	Fréquence

Ces traitements sont-ils systématiques ou font-ils suite à des observations à la parcelle* ?

4.2. L'itinéraire technique est-il le même pour toutes les parcelles de l'exploitation ou bien est-il adapté à chaque parcelle* ?

Si non, depuis quand les traitements cupriques ont-ils été abandonnés sur l'exploitation ?

5. Vendanges

5.1. A quelles périodes ont lieu généralement les vendanges de Cabernet Sauvignon et de Merlot ?

5.2. S'agit-il de vendange mécanique ou manuelle* ?

6. Taille d'hiver

6.1. Quel type de taille pratiquez-vous (gobelet, cordon, guyot, lyre...) ?

6.2. A quelle période pratiquez-vous la taille d'hiver pour ces deux cépages ?

7. Historique viticole

7.1. Depuis combien de temps la plus ancienne parcelle viticole du domaine est-elle cultivée en vigne ?

7.2. Depuis combien de temps la plus jeune parcelle viticole est-elle cultivée en vigne ?

Dans ce cas, quel était le précédent cultural (forêt, prairie..) ?

8. Maladies

8.1. Avez-vous des parcelles plus particulièrement touchées par les maladies du bois* ? oui – non

8.2. Avez-vous des parcelles plus particulièrement touchées par la flavescence dorée* ? oui - non

Merci infiniment pour votre participation !

