

Stimulation des défenses naturelles de la vigne Essais d'emploi du chitosan contre *Botrytis cinerea*

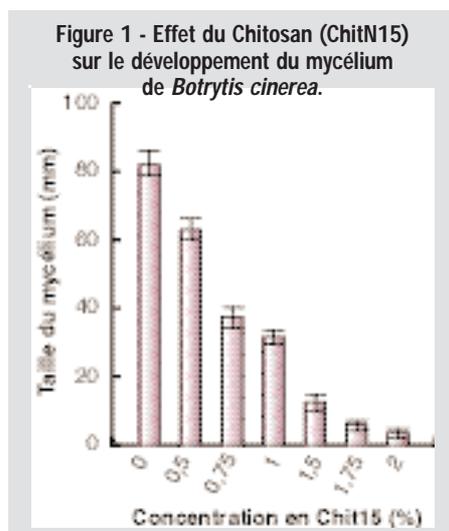
Ernest Amborabé*, Aziz Aziz*, Patricia Trotel-Aziz*, Daniel Quantinet**,
Laurent Dhuicq*** et Guy Vernet*

Dans la recherche de nouveaux produits de protection des plantes « écologiques », c'est-à-dire rapidement et complètement biodégradables, peu toxiques et d'origine naturelle, les dérivés de la chitine représentent une piste intéressante.

Pourquoi ? Parce que la chitine est un constituant de la paroi des champignons, notamment les « phytopathogènes » qui sont nuisibles aux plantes ; un dérivé de cette chitine soigneusement formulé appliqué sur une plante mimera une attaque de pathogène (sans les dégâts !) et déclenchera (« élicitera ») les mécanismes de défense de cette plante.

*L'étude présentée ici a consisté à tester les effets du chitosan⁽¹⁾ sur *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne. Des tests de laboratoire ont été effectués, le déclenchement des mécanismes de défense a été évalué au vignoble ainsi que l'efficacité contre la pourriture grise comparée à celle de fongicides chimiques.*

Les résultats sont prometteurs. Jugez-en.



Vu son implantation septentrionale, la vigne champenoise souffre d'un climat pluvieux. Ceci la rend vulnérable à de nombreuses maladies cryptogamiques (pourriture grise, mildiou, oïdium, black-rot...). Ces dernières sont combattues essentiellement au moyen de produits phytosanitaires chimiques de synthèse. Or les réglementations internationales tendent de plus en plus à limiter l'usage de ces produits en viticulture afin de respecter à la fois l'environnement et la santé du consommateur. Dans plusieurs régions de France, une des priorités pour une agriculture durable est de développer la lutte intégrée ou mieux l'agriculture raisonnée notamment par l'utilisation de nouvelles matières actives moins polluantes et à l'exploitation des défenses naturelles de la plante.

Au laboratoire d'éco-toxicologie de l'Unité de recherche vigne et vins de champagne (URCA), deux stratégies de lutte ont été étudiées en prévision de leur autorisation en lutte biologique.

La première consiste à utiliser des bactéries indigènes (endophytes et rhizosphériques de la vigne) impliquées dans la lutte biologique pour limiter directement ou indirectement la pression parasitaire chez la vigne ; la seconde approche vise à appliquer des produits biologiques d'origine naturelle à base de chitosaccharides — précisément du chitosan — pour stimuler les défenses naturelles de la vigne et/ou altérer directement le développement des agents pathogènes.

Le présent article constitue un bilan des avancées réalisées dans la seconde approche.

Plusieurs réponses de défense de la vigne

Comme la plupart des végétaux supérieurs (Kombrink & Somssich 1995), la vigne n'est pas démunie face à l'attaque des pathogènes : elle développe ses propres mécanismes de défense plus ou moins efficaces.

Les réponses de défense les plus performantes sont celles qui vont contrecarrer la manifestation de la maladie comme l'épaississement de la paroi végétale, la stimulation de la synthèse des phytoalexines, connues pour leurs propriétés antifongiques et antibactériennes (Jeandet *et al.*, 1991 ; Kuc, 1995 ; Smith, 1996) ou encore la production de protéines PR de type chitinases et glucanases capables de dégrader la chitine et les glucanes de la paroi des champignons (Van Loon & Van Strien, 1999).

(1) Qu'est-ce que le chitosan ?

Le chitosan est un déripolymère biologique de n-glucosamines obtenu par déacétylation de la chitine.



* Laboratoire d'Eco-Toxicologie, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne - UPRES- EA 2069, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51687 Reims cedex 02.

** Chambre d'agriculture de la Marne, 51000 Châlons-en-Champagne.

*** Agrolor, 17, rue L. Bonnevey, 54100 Nancy.

Ces réactions de défense sont également induites en réponse à l'application de fragments de chitine ou d'un dérivé de chitine (le chitosan) chez de nombreuses espèces végétales (Felix *et al.*, 1993 ; Linéart *et al.*, 1993 ; Côté *et al.*, 1998).

L'objectif de ces travaux est de caractériser les effets des produits à base de chitosan : d'une part sur le développement de l'agent pathogène et d'autre part sur l'activation de réactions de défense de la vigne en tenant compte de l'intensité et de la fréquence de la pression parasitaire.

Dans cette étude l'accent est mis sur *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise.

Inhibition du développement mycélien de *Botrytis cinerea* : étude au laboratoire

La capacité des produits à base de chitosan à inhiber le développement de *Botrytis cinerea* est estimée *in vitro* sur milieu gélosé « PDA » (potato-dextrose-agar). Une formulation expérimentale à base de chitosan, codée ChitN15, est testée à plusieurs concentrations à 22 °C en conditions aseptiques. Les résultats sont notés après 5 jours, durée pendant laquelle le mycélium de *B. cinerea* occupe toute la surface de la boîte témoin.

Les résultats montrent que le ChitN15 est capable d'inhiber le développement du mycélium de *Botrytis* à partir d'une concentration 0,75 % (soit 113 mg de chitosan/l de PDA) (Figure 1). Le développement du mycélium est complètement bloqué à partir de 1,5 % (225 mg/l).

Activation des réactions de défense de la vigne : étude au vignoble en 2002

Nous avons travaillé sur deux parcelles de vignoble champenois (Cernay-les-Reims et Nogent-l'Abbesse) avec le cépage Chardonnay. Des essais chimiques ont également été mis en place dans les mêmes parcelles. Nous rendons compte ici du suivi en conditions naturelles de l'expression des mécanismes de défense de la vigne après application de différentes molécules.

Stimulation de l'activité de la PAL (phénylalanine ammonia lyase)

La PAL est une enzyme clé de la synthèse de différents composés phénoliques et de l'acide salicylique réputé comme impliqué dans la résistance systémique acquise (SAR) (Delaney *et al.*, 1994 ; Nicholson & Hammerschmidt 1992).

Nous avons montré que l'activité PAL est stimulée dans les feuilles de vigne quelques jours après le premier traitement par pulvérisation de ChitN15 à 2 % effectué le 10 juin 2002 (Figure 2). Le maximum d'activité est observé aux alentours du 14^e jour.

Le deuxième traitement avec le ChitN15 effectué le 25 juin n'a pas augmenté le niveau d'activité de la PAL. Ceci suggère un processus de désensibilisation de la plante à une nouvelle application de ChitN15. Les traitements chimiques à base de fludioxonil, de procymidone puis de pyriméthanol (anti-botrytis) n'exercent pas d'effet significatif sur l'activité de PAL.

Effets sur l'activité de chitinase et de β -1,3-glucanase

Les chitinases sont des protéines PR, capables de dégrader les chitines de la paroi des organismes pathogènes. Elles sont présentes en grande quantité dans tous les tissus de vigne au cours de son développement ou en réponse à certains pathogènes comme le botrytis (Busam *et al.*, 1997 ; Robinson *et al.*, 1997).

Nous avons évalué les effets du chitosan sur l'activité totale des chitinases dans les feuilles. Il apparaît que cette activité est fortement stimulée après un délai de 14 jours suivant le premier traitement au ChitN15 (10 juin 2002) (Figure 3).

Cette activité est maintenue au moins durant un mois après la première application. Dans les conditions de nos expérimentations, il nous paraît difficile de confirmer ou d'infirmer si les deux applications ultérieures ont contribué à la stimulation et au maintien de cette activité enzymatique dans les feuilles. On remarque par ailleurs que la stimulation des chitinases intervient juste après que celle de la PAL soit affaiblie dans les feuilles traitées au ChitN15.

Cette induction successive de PAL et de chitinase peut s'intégrer dans une stratégie de défense

développée par la plante. Les traitements chimiques (fludioxonil, procymidone et pyriméthanol) n'induisent pas d'activité chitinase significative dans les feuilles de Chardonnay.

L'activité élicitrice du chitosan a également été évaluée en terme d'activation de β -1,3-glucanase. Les β -1,3-glucanases, comme les chitinases, sont des protéines PR capables de dégrader les β -1,3-glucanes constituant la paroi des nombreux champignons pathogènes.

En réponse à ChitN15, l'activité β -1,3-glucanase augmente très rapidement et fortement après une période de 7 jours de traitement (Figure 4 p. 28).

Cette activité se trouve maintenue pendant plusieurs jours.

Contrairement à la PAL, la production de ces deux enzymes se fait en trois temps : un temps de latence caractérisé par une activité enzymatique basale, un temps de forte accumulation dans les feuilles, caractérisé par une intense activité enzymatique et un temps de stabilisation d'activité enzymatique.

Les chitinases et les β -1,3-glucanases sont réputées agir en synergie pour une meilleure efficacité de leur potentiel destructeur de l'agresseur (Fritig *et al.*, 1998).

Figure 2 - Effets du chitosan (ChitN15) et des fongicides (chimiques) sur l'activité de PAL dans les feuilles de vigne.

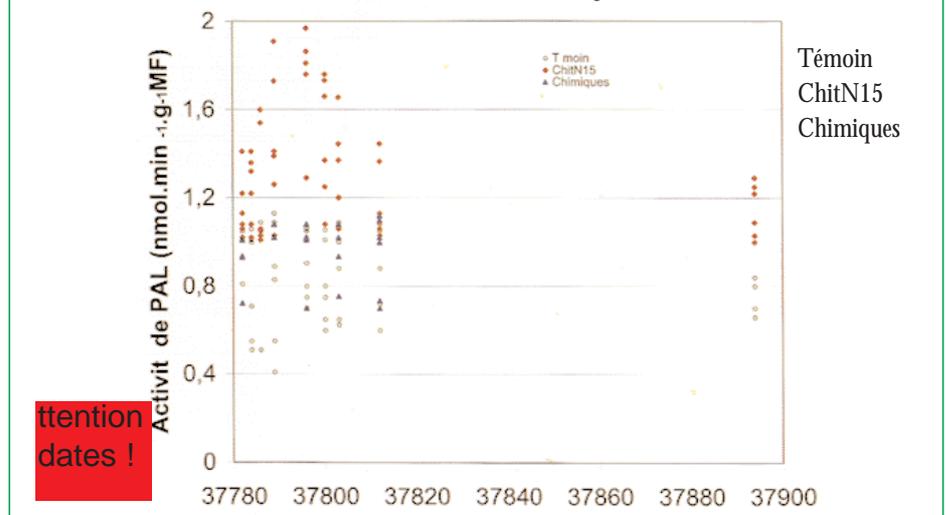


Figure 3 - Effets du chitosan (ChitN15) et des fongicides (chimiques) sur l'activité de chitinase dans les feuilles de vigne.

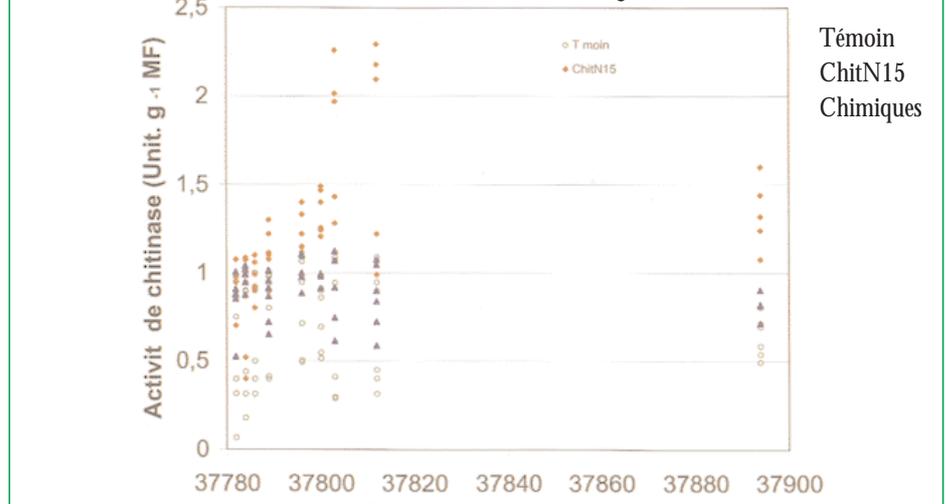


Figure 4 - Effets du chitosan (Chit15N) et des fongicides (chimiques) sur l'activité de b-1,3-glucanase dans les feuilles de vigne.

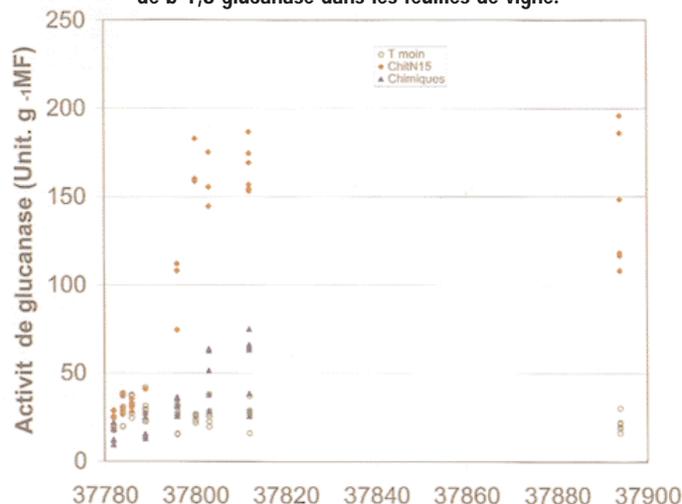


Figure 5 - Essai de Cernoy (Marne) en 2001.

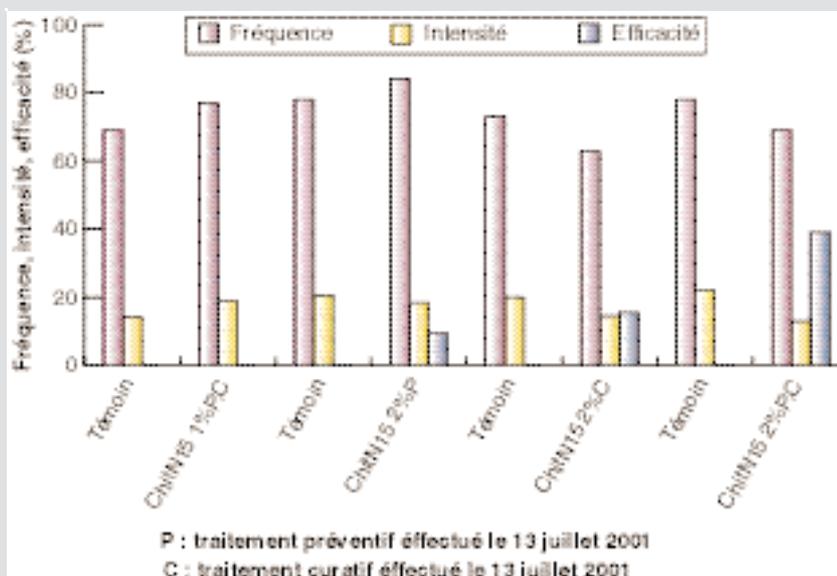
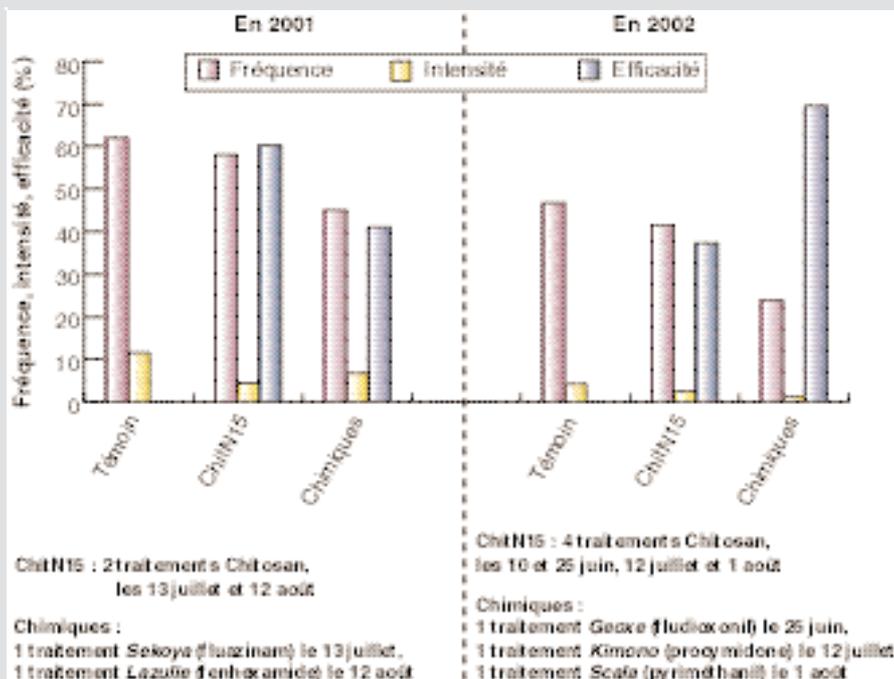


Figure 6 - Essais de Nogent l'Abbesse (Marne) en 2001 et 2002.



Protection au vignoble

Le ChitN15 (solution Agrolor) est appliqué par pulvérisation sur deux parcelles de Chardonnay (Nogent-l'Abbesse et Cernay-les-Reims). Nous présentons ici les résultats de deux campagnes d'essais réalisés en 2001 et 2002 (Figures 5 et 6). La contamination par le botrytis est évaluée en termes d'intensité et de fréquence.

Cernay en 2001

Dans la parcelle de Cernay (Figure 5), l'intensité d'attaque de botrytis dans les témoins va de 20,1 à 22,1 % en 2001 et la fréquence de contamination des baies est de l'ordre de 73 à 78 %.

Une diminution sensible d'intensité et de fréquence de la maladie a été obtenue avec ChitN15 à 2 % en traitement curatif (le 12 août), avec une efficacité estimée à 16 %.

Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque ChitN15 2 % a été appliqué deux fois, en préventif (13 juillet) puis en curatif, avec une efficacité de 40 % contre le botrytis.

En revanche, les traitements au ChitN15 à 1 % (préventif + curatif) et le traitement préventif à 2 % ne semblent pas avoir d'effet significatif sur la fréquence et l'intensité de la pourriture grise.

Nogent-l'Abbesse en 2001 et 2002

Dans la parcelle de Nogent-l'Abbesse (Figure 6), sans traitement l'intensité d'attaque de botrytis en 2001 variait de 11,2 à 11,9 %, et la fréquence de contamination de 59 à 65 %. Les deux applications de ChitN15 à 2 % ont été effectuées, là aussi, les 13 juillet et 12 août. Mais à Nogent, l'intensité de la pourriture grise tombe à 4,6 %. Le chitosan permet donc une protection contre Botrytis de l'ordre de 60 % dans les conditions de ce vignoble. En même temps, l'application de deux fongicides chimiques (fludioxonil au stade B le 13 juillet et fenhexamide au stade C le 12 août) a eu une efficacité moindre, de l'ordre de 41 %.

En 2002, la vigne a été traitée au ChitN15 à 2 % les 10 et 25 juin, 12 juillet et 1^{er} août. Ces quatre traitements (préventif + curatif) ont conduit à une protection contre le botrytis de 37 % par rapport au témoin. Pour les traitements fongicides (fludioxonil au stade A le 25 juin, procymidone au stade B le 12 juillet puis pyriméthanil au stade C le 1^{er} août), la protection contre le botrytis est de l'ordre de 69 %.

En conclusion

En 2001, l'effet du chitosan sur la fréquence et l'intensité des attaques diffère fortement entre deux parcelles traitées les mêmes jours et aux mêmes doses. Ceci suggère que les interactions génotype (cépage-porte-greffe)/facteurs abiotiques du milieu/pratiques culturales jouent un rôle important, au travers du fonctionnement de la plante, sur la potentialisation et l'expression des défenses naturelles.

En 2002, les résultats montrent une corrélation entre réponses de défense induites et pourcentage de protection de la vigne contre *B. cinerea*.

Par ailleurs, on l'a vu en 2001, deux applications de chitosan sont plus efficaces qu'une. Mais le passage à 4 applications en 2002 (contre 2 en 2001) ne semble pas améliorer l'efficacité de la protection. Ce dernier constat n'est pas un résultat reproductible (il est difficile de comparer des efficacités sur deux années différentes) mais il ouvre une piste de travail.

ChitN15, inducteur des activités des enzymes de défense, protège de façon relativement importante les baies de raisin contre *B. cinerea*. Il s'est avéré actif en traitements préventif et curatif contre le botrytis en réduisant l'intensité et la fréquence d'attaque sur les baies de raisin. Ceci relève de son effet direct (souvent fongista-

tique) et indirect (élicitation des réactions de défense de la vigne).

Des essais sont en cours pour évaluer, à l'aide de biotests sur boutures, la capacité du ChitN15 à protéger la vigne contre d'autres maladies.

Diverses formulations de chitosan de degrés de polymérisation et de déacétylation variables sont à l'étude. Leurs effets sont recherchés à la fois au niveau des différentes réactions de défense de la vigne et au niveau des facteurs de virulence de l'agent pathogène. Des biomarqueurs physiologiques chez des végétaux ou animaux non cibles seront également pris en compte pour vérifier l'impact éco-toxicologique éventuel des molécules les plus performantes. n

Summary

CHITOSAN AGAINST BOTRYTIS CINEREA ON VINEYARD

Experiments were performed in Champagne using chitosan preparations to evaluate their ability to protect grapevine against fungal diseases. The chitosan is a biological polymer, derived from chitin by deacetylation reaction, could substitute chemical fungicides.

The results presented here show that chitosan (ChitN15 gift by Agrolor society) is able to protect grapevine berries against Botrytis cinerea in the vineyard.

The ChitN15 was shown to be efficient under preventive and curative treatments against Botrytis by reducing the intensity and frequency of grey mould on berries. The efficiency of this product is similar to that obtained by chemical fungicides (fludioxonil, procymidone and pyriméthanil).

This protection could result from either fungistatic effect of chitosan on Botrytis cinerea, or its capacity to trigger the elicitation of defense reactions of grapevine. Because it is highly biodegradable chitosan could become attractive for integrated protection.

Key words : vineyards, Botrytis cinerea, chitosan, elicitation of defence reaction, integrated pest management.

Résumé

Des expérimentations ont été réalisées en Champagne pour évaluer la capacité de produits à base de chitosan à protéger la vigne contre la pourriture grise, comparée à celles de fongicides chimiques. Le chitosan est un polymère biologique de *n*-glucosamines obtenu par déacétylation de la chitine.

Les résultats présentés ici montrent qu'une formulation expérimentale à base de chitosan (ChitN15, de la société Agrolor) est capable de protéger la vigne contre le botrytis au vignoble. Le ChitN15 appliqué en traitements préventif puis curatif contre la pourriture grise réduit l'intensité et la fréquence de l'attaque de Botrytis cinerea sur les baies de raisin. L'efficacité de ce produit est comparable à celle des fongicides de synthèse.

Cette protection résulte d'une part d'un effet fongistatique direct du chitosan sur Botrytis cinerea, et d'autre part de sa capacité à stimuler des réactions typiques de défense de la vigne. Le caractère hautement biodégradable du chitosan le rend particulièrement attrayant en protection intégrée.

Mots-clés : vigne, pourriture grise, Botrytis cinerea, chitosan, éliciteur, stimulation de défense naturelle, protection intégrée.

Bibliographie

- BUSAM G., KASSEMAYER H.H., MATERN U., 1997 - Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.* 115: 1029-1038.
- CÔTÉ F., HAM K.S., HAHN M.G. & BERGMANN C.W., 1998 - Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. Generation, perception, and signal transduction. In: Biswas and Das, Eds, *Subcellular biochemistry*, Plenum Press, New York, pp. 385-432.
- DELANEY T.P., UKNES S., VERNOOIJ B., FRIEDRICH L., WEYMANN K., NEGROTTO D., GAFFNEY T., GUT-RELLA M., KESSMANN H., WARD E. AND RYALS J., 1994 - A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, 1, 1247-1249.
- FELIX G., REGENASS M., AND BOLLER T., 1993 - Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells. *Plant J.*, 4, 307-316.
- FRITIG B., HEITZ T., LEGRAND M., 1998 - Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 16-22.
- JEANDET P., BESSIS R., GAUTHERON B., 1991 - The production of resveratrol (3,5,4'-trihydrostilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 41-46.
- KOMBRINK E. AND SOMSSICH I.E., 1995 - Defense responses of plants to pathogens. *Adv. Bot. Res.*, 8, 1-34.
- KUC J., 1995 - Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 132, 275-297.
- LIÉNART Y., GAUTIER C., & DUMARD A., 1993 - Chitosan elicited laminarinase activity in *Rubus* cells or protoplasts. *Phytochemistry*, 34, 621-624.
- NICHOLSON R.L. AND HAMMERSCHMIDT R., 1992 - Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 197, 369-389.
- ROBINSON S.P., JACOBS A.K., DRY I.B., 1997 - A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114: 771-778.
- SMITH C.J., 1996 - Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *New Phytol.* 361, 1-45.
- VAN LOON L.C. AND VAN STRIEN E.A., 1999 - The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 3, 85-97.