



Facteurs de résistance à l'oïdium (*Erysiphe necator* Schwein.) chez la vigne (*Vitis vinifera* L.)



Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel pour l'obtention du titre de
Docteur ès Sciences

par

Sylvain Schnee

Ingénieur en Agriculture (ESITPA, France)

Comité de Thèse:

Prof. Dr. Jean-Marc Neuhaus, Président
Dr. Olivier Viret, Directeur de thèse
Dr. Brigitte Mauch-Mani, Rapporteur
Dr. Katia Gindro, Expert
Dr. Didier Merdinoglu, Expert
Dr. André Rawyler, Expert

Date de soutenance : décembre 2008

IMPRIMATUR POUR LA THESE

Facteurs de résistance à l'oïdium
(*Erysiphe necator* Schwein.)
chez la vigne (*Vitis vinifera* L.)

Sylvain SCHNEE

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury

Mmes K. Gindro (Changins), B. Mauch-Mani,
MM. O. Viret (Changins, directeur de thèse), J.-M. Neuhaus (co-directeur de thèse),
D. Merdinoglu (INRA, Colmar F) et A. Rawiler (Changins)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 11 février 2009

Le doyen :
F. Kessler

UNIVERSITE DE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat - décanat de la faculté
Rue Emile-Argand 11 - CP 158
CH-2009 Neuchâtel
Felix Kessler

Table des matières

Résumé / Abstract	1
Liste des abréviations	2

Introduction générale

1 Agent pathogène de l'oïdium	3
1.1 Taxonomie	3
1.2 Description de l'anamorphe	4
1.3 Description du téléomorphe	5
1.4 Biologie	6
1.5 Symptomatologie	7
2 La vigne (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	8
2.1 Importance de la vigne cultivée.....	8
2.2 Lutte actuelle	9
2.3 Réceptivité de l'hôte	10
2.4 Sélection de cépages résistants	10
3 Interaction hôte-pathogène.....	12
3.1 Processus infectieux fongique	12
3.2 Réactions de défense de l'hôte	15
3.2.1 Reconnaissance du pathogène	15
3.2.2 Facteurs de résistance constitutifs.....	15
3.2.3 Facteurs de résistance induits.....	19
4 Objectifs de ce travail de recherche.....	21

Matériel et Méthodes

1 Matériel biologique	23
2 Méthode d'inoculation et suivi des infections.....	24
3 Microscopie.....	25
3.1 Microscopie optique	25
3.1.1 Visible.....	25
3.1.2 Epifluorescence	25
3.2 Microscopie électronique à balayage	25
3.3 Microscopie électronique à transmission	26
4 Analyse qualitatives et quantitatives de phytoalexines stilbéniques.....	26
4.1 Extraction et purification des stilbènes	26
4.2 Etude de l'effet biocide du resvératrol et ses dérivés sur la germination des conidies d' <i>E. necator</i>	27
4.3 Analyse du contenu en stilbènes de disques foliaires infectés.....	27
5 Analyses qualitatives et quantitatives des cires cuticulaires.....	28
5.1 Echantillonnage des cires cuticulaires de la surface adaxiale des feuilles.....	28
5.1.1 Extraction mécanique sélective des cires épicuticulaires	28
5.1.2 Extraction des cires cuticulaires totales	29
5.2 Traitement des échantillons et analyse chimique.....	29
5.3 Chromatographie en couche mince	30
6 Analyse du complexe de cutine.....	30

6.1	Extraction et purification de cutine et analyse de leur composition chimique ..	30
6.2	Détermination et localisation d'une activité cutinase dans les conidies d' <i>E. necator</i>	31
6.2.1	Détermination d'une activité estérase	31
6.2.2	Localisation histochimique de l'activité estérase	32
6.2.3	Détermination d'une activité cutinase	32
6.2.4	Extraction des protéines pariétales de conidies non germées de <i>Botrytis cinerea</i>	32
6.3	Analyse des monomères de cutine libérés après hydrolyse enzymatique:	33
7	Détection de QTL de résistance à l'oïdium	34
7.1	Matériel végétal et extraction d'ADN	34
7.2	Extraction de l'ADN des individus de la population.....	34
7.3	Génotypage.....	34
7.4	Evaluation phénotypique	35
7.5	Analyse et détection de QTL	36
8	Traitement statistique	37

Résultats et Discussion

Chapitre I: Suivi du développement d'*Erysiphe necator* sur des hôtes de sensibilité différente

1	Introduction	39
2	Résultats.....	39
2.1	Développement des structures infectieuses d' <i>E. necator</i> sur un hôte référencé sensible	39
2.2	Formation de l'haustorium.....	42
2.3	Comparaison de développement d' <i>E. necator</i> sur différents hôtes.....	43
2.4	Observation des structures de reproduction sexuée.....	45
3	Discussion.....	46

Chapitre II: Contribution des cires cuticulaires dans la résistance à *Erysiphe necator*

1	Introduction	49
2	Résultats.....	51
2.1	Extraction chimique	51
2.2	Extraction sélective des cires épicuticulaires et intracuticulaires	53
2.3	Microscopie électronique	54
2.4	Composition des cires épicuticulaires et intracuticulaires	57
2.5	Composition des cires épicuticulaires et phases initiales d'infection par <i>E. necator</i>	59
2.6	Effet de fractions de cires de <i>V. vinifera</i> cv. Chasselas et de <i>V. candicans</i> sur le développement d' <i>E. necator</i>	61
3	Discussion.....	63
3.1	Méthodes analytiques	63
3.2	Composition des cires cuticulaires.....	64
3.3	Microstructure et propriétés physiques des surfaces étudiées.....	65
3.4	Composition des cires épicuticulaires et intracuticulaires, et interaction avec <i>E. necator</i>	67
3.5	Composés chimiques spécifiques liés au développement d' <i>E. necator</i>	68
3.6	Conclusion	70

Chapitre III: Contribution du polymère de cutine dans la résistance à *Erysiphe necator*

1	Introduction	73
2	Résultats.....	74
3	Discussion.....	80
3.1	Activité enzymatique d' <i>E. necator</i>	80
3.2	Composition chimique de la cutine de <i>Vitis</i>	83
3.3	Conclusion	85

Chapitre IV: Contribution du compartiment cellulaire dans la résistance à *Erysiphe necator*

1	Introduction	87
2	Résultats.....	88
3	Discussion.....	94

Chapitre V: Identification de QTL de résistance à *Erysiphe necator* issus de *V. vinifera* cv Bronner

1	Introduction	97
2	Résultats.....	98
2.1	Distribution des différents caractères phénotypiques au sein de la population	98
2.2	Détection de QTL	100
3	Discussion.....	102
3.1	Pertinence des critères phénotypiques.....	102
3.2	Outils d'investigations.....	103
3.3	QTL détectés	104
3.4	Conclusion	105

Discussion générale	107
----------------------------------	------------

Références bibliographiques	115
--	------------

Liste des tableaux et des figures	131
---	-----

Remerciements	135
---------------------	-----

Résumé

L'oïdium est une maladie fongique ubiquiste de la vigne (*Vitis vinifera*), dépréciant la récolte. L'agent responsable, *Erysiphe necator*, est un pathogène biotrophe obligatoire ectophyte, envoyant des structures infectieuses spécialisées dans les cellules épidermiques de l'hôte afin d'assurer le prélèvement de nutriments et assurer la croissance fongique. L'existence d'espèces résistantes au sein des *Vitis* a permis d'étudier les différents compartiments cellulaires, responsables de la manifestation des mécanismes de défense contre l'oïdium. L'étude des cires épicuticulaires d'espèces sensibles et résistantes a mis en évidence que le motif de cristallisation en forme d'assiettes, lié à une composition chimique spécifique, est responsable de l'inhibition de la germination des conidies du pathogène. Une cutinase pariétale constitutive a été identifiée chez les conidies d'*E. necator*. Cette enzyme participe au processus de dégradation du polymère de cutine, dont la composition chimique diffère selon l'espèce de *Vitis* étudiée. Dans le compartiment cellulaire, la synthèse de phytoalexines stilbéniques a été rapportée au nombre de sites infectieux matérialisés par les appressoria. L'accumulation de δ - et d' ϵ -viniférine apparaît étroitement liée à l'observation de l'arrêt de développement du pathogène sur des espèces résistantes. Une recherche de loci contrôlant le caractère de résistance à l'oïdium (*Quantitative Trait Loci*) en provenance de *V. vinifera* cv Bronner, a identifié plusieurs marqueurs microsatellites associés avec une région chromosomique gouvernant les critères phénotypiques étudiés. Les résultats obtenus contribuent à l'approfondissement des connaissances liées à l'interaction *E. necator* – *V. vinifera*, dans l'optique du développement de marqueurs utilisables dans un programme de sélection variétale.

Mots-clés: *Erysiphe necator*, *Vitis vinifera*, résistance, appressorium, cires épicuticulaires, cutine, cutinase constitutive, stilbènes, viniférines, QTL, sélection assistée par marqueur.

Abstract

Powdery mildew is one of the most important fungal diseases of cultivated grapevine (*Vitis vinifera*). The causal agent, *Erysiphe necator*, is an obligate biotrophic pathogen epiphyte producing specialized infectious structures in the host epidermal cells to take up nutrients. The occurrence of resistant species within the genus *Vitis* allows studying the role played by different cellular compartments in powdery mildew defence mechanisms. The comparison of epicuticular waxes among susceptible and resistant species highlights the crystallisation patterns, due to specific chemical compositions, as responsible for the inhibition of conidial germination. Qualitative differences have been found in the cutin polymer of the studied species of *Vitis*, whose is degraded by a constitutive cutinase indentified in *E. necator* conidial cell wall during the infection process. The amount of infectious sites, observed as appressoria, was shown to be directly dependent on the stilbenic phytoalexins synthesis in epidermal cells. More specifically, as revealed by differences between resistant and susceptible species, the higher the δ - and ϵ -viniferin production the smaller is the infection occurrence. The research of powdery mildew resistance QTL (*Quantitative Trait Loci*) associated to *V. vinifera* cv Bronner, allowed to identify several microsatellite markers associated with a chromosomal region controlling the phenotypic criteria. The results of this work contribute to better understand the *E. necator* – *V. vinifera* interaction and, furthermore, to develop reliable markers to select disease-resistant cultivars in breeding programs.

Key words: *Erysiphe necator*, *Vitis vinifera*, resistance, appressorium, epicuticular waxes, cutin, constitutive cutinase, stilbenes, viniferins, QTL, marker-assisted selection.

Liste des abréviations

$\mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$: micromole par seconde et par mètre carré

Å : angstrœm

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

CCM: chromatographie en couche mince

CE: cires épicuticulaires

CI: cires intracuticulaires

cM : centi-Morgan

cpm : coups par minute

cv: cultivar

g.L^{-1} : gramme par litre

h : heure

HCl : acide chlorhydrique

hpi : heures post-infection

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR : humidité relative

jpi : jours post-inoculation

kHz : kiloHertz

kV : kiloVolt

M : molaire

m/v : masse/volume

MEB: Microscope Electronique à Balayage

MET: Microscope Electronique à Transmission

MPa: MégaPascals

N_2 : diazote

PF: poids frais

rpm : rotations par minute

UV: Ultra Violet

v/v : volume/volume

W m^{-2} : watt par mètre carré

Introduction générale

Historiquement cultivée pour sa production de raisins et sa transformation en vins, la vigne est une plante économiquement importante, dont l'essor se manifeste par des débouchés nouveaux tels que les dérivés alimentaires ou encore les produits cosmétiques. En 2007, 49% du vignoble mondial était concentré en Europe occidentale et représentait une part importante de la valeur économique de la production agricole. L'obtention d'une récolte de qualité nécessite cependant une protection sanitaire indispensable envers les principaux pathogènes fongiques. Le secteur viticole est devenu le premier consommateur de produits phytosanitaires par unité de surface agricole, pour lutter essentiellement contre le mildiou (*Plasmopara viticola*), l'oïdium (*Erysiphe necator*) et la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Aussi, le coût de la gestion des maladies tient une part importante de la valeur de la production viticole.

L'agent pathogène de l'oïdium est un champignon biotrophe obligatoire (*Erysiphe necator*) qui établit une interaction au sein des cellules infectées, afin de prélever les nutriments nécessaires à la croissance fongique. Les recherches actuelles se focalisent sur l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre le pathogène, notamment basées sur la détermination des mécanismes mis en jeu lors de l'interaction hôte – pathogène.

1 Agent pathogène de l'oïdium

1.1 Taxonomie

Les champignons responsables des maladies désignées sous le nom d' "oïdiums" appartiennent à l'ordre des *Erysiphales* (famille des *Erysiphaceae*) au sein des ascomycètes (Bolay, 2005). Ce sont principalement des pathogènes obligatoires disposant d'une multiplication végétative rapide et s'attaquant à la plupart des plantes cultivées et sauvages. *Erysiphe necator* est spécifique de la vigne et a été décrit pour la première fois par Schweinitz en 1834. Plusieurs synonymies existent, dont *Uncinula necator* Schweinitz Burrill (1892) encore couramment employé aujourd'hui. Suite au développement de nouvelles techniques d'investigation (microscopie électronique à balayage et séquençage des unités ribosomiques), la systématique des *Erysiphaceae* basée sur les caractères morphologiques distinctifs de l'anamorphe (stade asexué) et du téléomorphe (stade sexué) a été remise en cause. Sur la base des travaux phylogénétiques récents de Braun et Takamatsu (2000), *Uncinula necator* a été retransféré dans le genre *Erysiphe*, comme initialement proposé par Saccardo en 1882 (Figure 1).

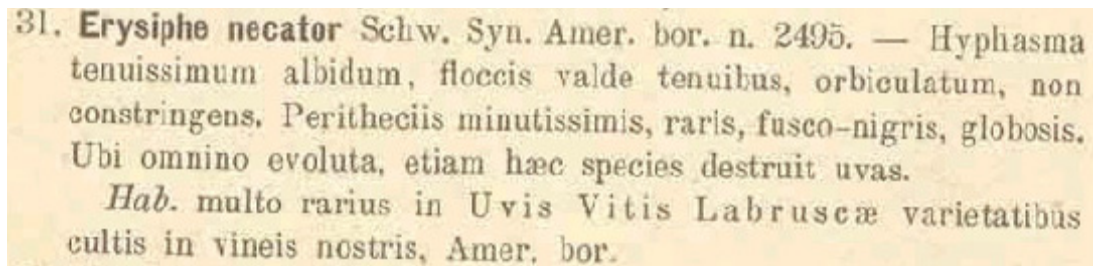


Figure 1 Description d'*E. necator* par Saccardo dans l'ouvrage intitulé *Sylloge Fungorum*, volume I, p. 22 (1882): "... Hyphe blanchâtre, tend à faire une colonie floconeuse, sphérique, non constringent. Perithèces minuscules, rares, brun-noires, globuleuses, ubiquistes ..."

1.2 Description de l'anamorphe

Erysiphe necator est un ectoparasite, dont le mycélium filamenteux et cloisonné se développe uniquement à la surface des organes de l'hôte. Il est amphigène sur feuilles (se développe indifféremment sur les deux faces du limbe) et s'observe sur l'ensemble des parties herbacées de la vigne. Les hyphes mycéliens sont hyalins, septés, mononuclés et alternent dans la formation d'appressoria ou l'élaboration d'un conidiophore (Leinhos *et al.*, 1997). Les nombreuses ramifications d'hyphes aboutissent à la formation d'un réseau mycélien dense, dont l'apparence de poussière grisâtre est à l'origine de la dénomination anglosaxonne de « mildiou poudreux » (*powdery mildew*). Le parasitisme s'accomplit par l'élaboration d'un appressorium (du latin "apprimere" qui signifie "presser contre"), organe lobé, isolé ou par paire, spécialisé dans la perforation de la cuticule afin d'installer un haustorium dans les cellules épidermiques. Ce suçoir de type globulaire assure la nutrition du champignon au détriment de la cellule infectée (Heintz et Blaich, 1990).

La reproduction végétative est assurée par des conidiophores de type pseudoïdium (Figure 2), hyphes dressés perpendiculairement par rapport au plan du réseau mycélien d'une longueur pouvant atteindre 400 µm. La cellule basale peut-être flexueuse voire torsadée suivie de 1 à 3 autres cellules généralement plus courtes. Des conidies isolées sont portées à l'apex présentant une paroi striée, écailleuse tandis que la paroi du septum conidien apparaît fibrillaire. Elles sont ellipsoïdo-ovoïdes à doliiformes, de 22.5-48 x 12-22 µm. La production de conidies est de type basauxique: elles se forment successivement avec chaque conidie nouvellement formée à la base de la conidie mature précédente. Elles apparaissent en chaîne, si aucune perturbation atmosphérique n'assure leur dispersion.

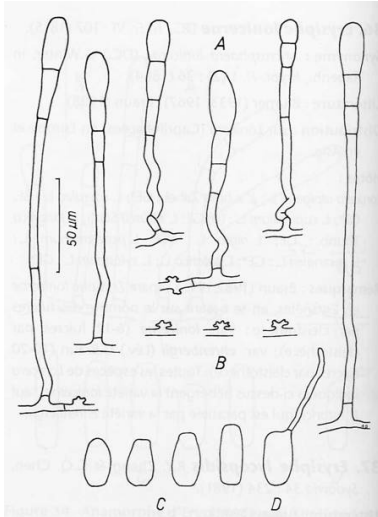


Figure 2 Anamorphe d'*E. necator* d'après Bolay (2005). A. conidiophores de type pseudoïdium avec une cellule basale flexueuse à torsadée, B. appressoria lobés, C. conidies, D. conidie avec un tube germinatif.

1.3 Description du téléomorphe

La reproduction sexuée résulte de la fusion de deux hyphes de types sexuels compatibles (Smith, 1970). Ce mode hétérothallique produit un cleistothèce ou ascocarpe (Figure 3), corps globulaire polygonal de 80-130 µm de diamètre, brun-noir à maturité, ornés de 10 à 30 fulcres (appendices filiformes insérés en position équatoriale, flexueux et longs de 1 à 6 fois le diamètre de l'ascocarpe). Chez *E. necator*, les fulcres se terminent par une crosse et cette morphologie joue probablement un rôle dans l'ancrage du pathogène sur l'hôte. Les cleistothèces contiennent généralement entre 4 et 8 asques pédicellés ou sessiles, de 40-70 x 25-45 µm, chaque asque logeant 4 à 6 ascospores ellipsoïdo-ovoïdes, de 15-25 x 9-15 µm.

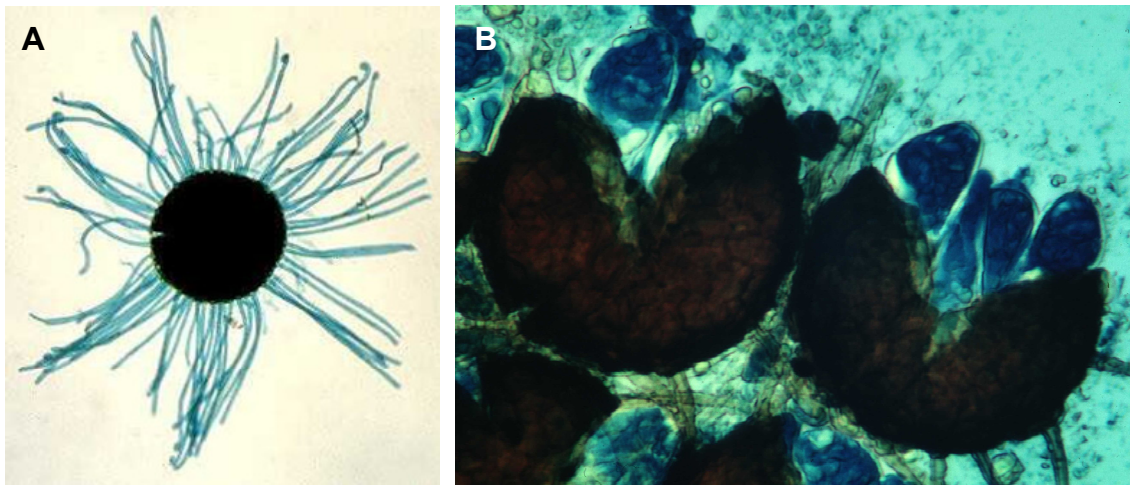


Figure 3 Cleistothèces d'*E. necator* observés en microscopie photonique. A. Cleistothèce mature; B. Déhiscence de cleistothèces libérant des asques.

1.4 Biologie

L'optimum de germination des conidies et de croissance du mycélium s'observent à 25°C (Delp, 1954) et 85% HR (Carroll et Wilcox, 2003) (Figure 4). Le développement d'*E. necator* ralentit proportionnellement à l'écart de ces optima climatiques, pour atteindre des limites létales à 4°C et 35°C. Les pluies fines sont favorables au champignon en augmentant l'humidité relative de l'air, tandis que les fortes précipitations lessivent les colonies établies. En outre, l'eau libre réduit le taux de germination par éclatement des conidies, et inhibe la formation d'appressoria (Corio-Costet, 2007). Arnaud (1931) a observé un développement accru du pathogène au sein d'un volume foliaire dense, qui limite la pénétration de la lumière. Les radiations UV B ralentissent les processus de germination et de croissance mycélienne (Willocquet *et al.*, 1996). Une plante vigoureuse par un apport azoté combiné à une faible dose d'UV accroît le développement d'*E. necator* (Keller *et al.*, 2003). Un mouvement foliaire dû à une vitesse de vent supérieure à 3 m s⁻¹ et l'impact de gouttes de pluie permet la dispersion des conidies (Willocquet *et al.*, 1998). Dans le cadre de la protection phytosanitaire, les pulvérisateurs atteignent des vitesses de pulsion d'air largement supérieure à cette valeur et peuvent participer activement à la dissémination du pathogène.

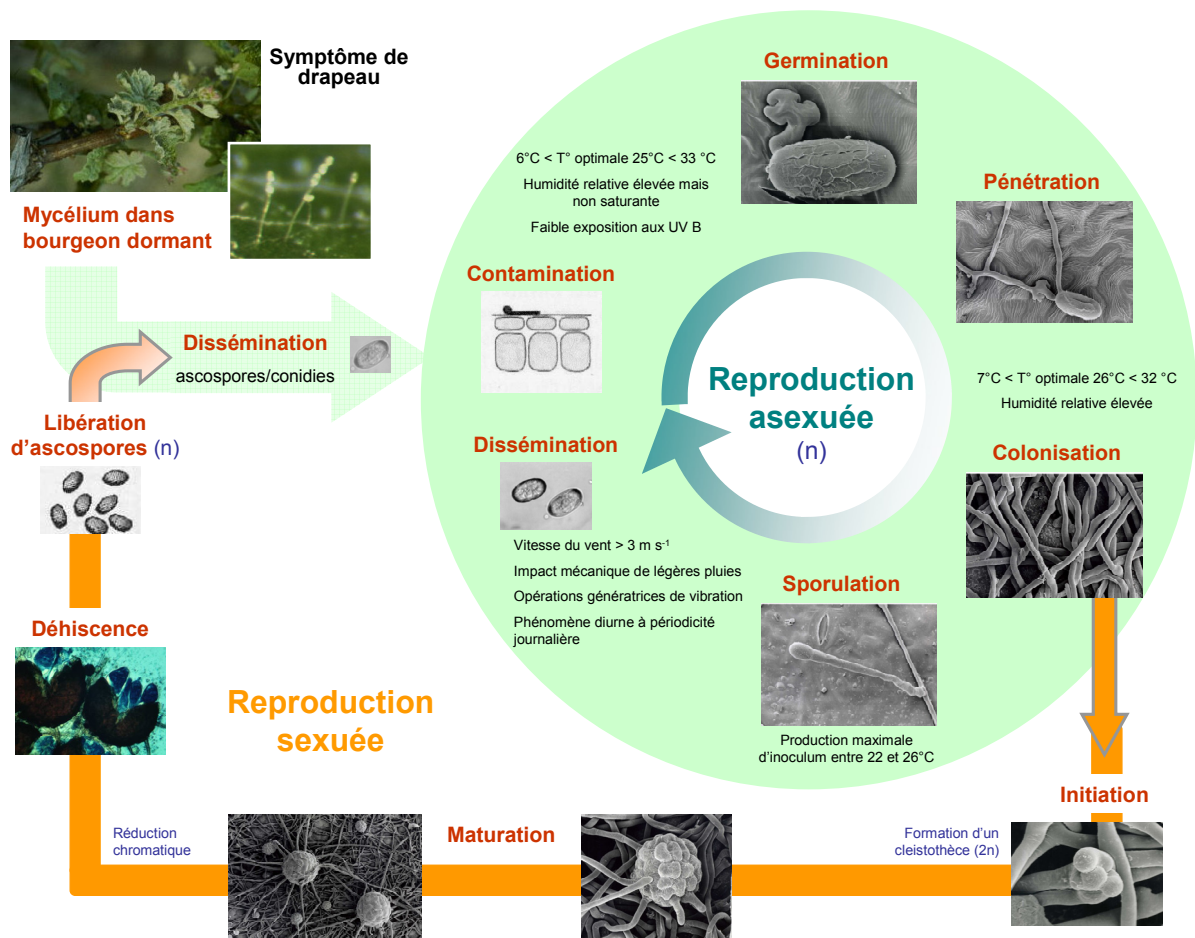


Figure 4 Cycle biologique et caryologique d'*E. necator*.

La spécificité de biotrophie rend les oïdiums capables de survivre lors de périodes d'activité restreinte, où les tissus de l'hôte ne sont pas disponibles. Les cleistothèces sont des structures résistantes, adaptées aux basses températures (Pearson et Gadoury, 1987). Cependant, *E. necator* est également capable de passer l'hiver dans des bourgeons dormants sous forme mycélienne (Sall et Wrynski, 1982; Pearson et Gärtel, 1984). Après éclosion, les bourgeons infectés expriment la maladie sous forme de "drapeaux", constituant l'inoculum primaire d'initiation de l'épidémiologie (Bélanger *et al.*, 2002). Les jeunes pousses présentent de larges plages de mycélium et provoquent des malformations foliaires, dont les bordures sont recourbées vers le haut (Rügner *et al.*, 2002). L'observation de l'une ou l'autre forme d'hivernage semble être liée aux régions viticoles, aux cépages et aux modes de conduite (Corio-Costet, 2007).

1.5 Symptomatologie

L'évaluation précise des dommages occasionnés par l'oïdium (Figure 5) est difficile à déterminer dans le cas d'une plante hôte pérenne car de nombreux paramètres doivent être pris en considération, comme l'estimation de l'impact de la maladie sur la physiologie de la plante à long terme, la réduction du rendement et la dépréciation qualitative de la récolte. D'un point de vue épidémiologique, le développement de la maladie d'une année module le réservoir d'inoculum des années à venir, mais semble principalement tributaire des conditions climatiques adéquates à l'infection. Les conséquences de la maladie sur les pertes de rendement varient selon la sévérité de l'infection, la variété cultivée, le système de production et la stratégie de lutte contre les maladies. De nombreux travaux ont toutefois mesuré les conséquences de la maladie sur la plante et sa production. Pool *et al.* (1984) ont mis en évidence une réduction de la taille de la plante et par conséquent du potentiel de production à long terme. Les mêmes auteurs ont également observé une augmentation des risques de gel, résultant d'une production réduite de réserve dans les sarments.

Les effets d'une infection à court terme se manifestent par une réduction du taux de photosynthèse et de l'utilisation de l'eau (Lakso *et al.*, 1982). Brem *et al.* (1986) ont montré qu'une infection provoquée par *E. necator* et *Plasmopara viticola* réduisait respectivement de 40 % et de 85 % l'activité photosynthétique nette. En outre, l'activité des principales enzymes impliquées dans la photosynthèse se réduit de moitié, cinq jours après une infection avec *E. necator*. L'augmentation parallèle des concentrations de glucose, fructose et sucrose dans les tissus infectés engendre un déclin progressif de l'activité du cycle de Calvin, menant à l'inhibition du processus photosynthétique (Scholes *et al.*, 1994). D'un point de vue qualitatif, Gadoury *et al.* (2001) mentionnent une acidification accrue des baies au détriment de l'accumulation de sucres, ainsi qu'un changement de couleur du moût de la variété Concord. Ces constatations ont été

validées par Calonnec *et al.* (2004) sur les cépages Cabernet Sauvignon et Sauvignon blanc, sur lesquels la perte de poids de baies infectées peut atteindre 45%. Les grappes infectées par *E. necator* renferment trois composés majoritaires fortement odorants, tels que le 1-octen-3-one (odeur de champignon), (Z)-1,5-octadien-3-one (odeur de feuille de géranium) et un composé non identifié dégageant une odeur de poisson (Darriet *et al.*, 2002). Toutefois, la transformation des composés odorants durant la fermentation alcoolique explique la disparition de l'arôme de champignon, spécifique aux grappes infectées.



Figure 5 Symptômes d'oïdium observés sur feuille de *V. vinifera* cv Chasselas (A) et sur grappe de *V. vinifera* cv Müller-Thurgau (B).

2 La vigne (*Vitis vinifera* L.)

2.1 Importance de la vigne cultivée

La vigne appartient à la famille des *Vitaceae*, et comprend 19 genres (Huglin, 1986), dont seul le genre *Vitis* est exploité en viticulture. Celui-ci est subdivisé en deux sous-genres: *Muscadinia* ($2n = 40$) et *Euvitis* ($2n = 38$). L'espèce *Muscadinia rotundifolia*, dont les formes sauvages croissent sur le continent nord américain, présente peu d'intérêt d'un point de vue œnologique, mais constitue une source de résistance à de nombreux pathogènes de la vigne. La section *Vitis* comprend la quasi-totalité des espèces cultivées, différenciée selon leur origine et leur répartition géographique. La zone asiatique recense une dizaine d'espèces dont la plus commune est *V. amurensis*, employée dans les schémas de sélection pour sa résistance au froid et à *Plasmopara viticola*, agent du mildiou de la vigne. La zone américaine comprend une vingtaine d'espèces (par exemple *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*) dont certaines sont utilisées comme porte-greffe pour lutter contre *Phylloxera vastatrix* depuis le XIX^e siècle. Elles ont également été intégrées dans des croisements pour l'obtention d'hybrides producteurs, plus résistants aux maladies cryptogamiques. La zone eurasiatique ne comporte qu'une

seule espèce, soit *Vitis vinifera* L., qui comprend l'ensemble des cépages, cultivés pour leurs intérêts agronomiques et oenologiques.

Le caractère historique (marque de civilisation par le culte de Dionysos ou de Bacchus) et ecclésiastique (le vin est assimilé à l'image du sang du Christ – planter de la vigne *ad maiorem Dei gloriam*) de cette culture ont perpétué la plantation et la consommation des produits de la vigne à travers les siècles (Galet, 2000). Le vignoble mondial représente 7.9 millions d'hectares pour une production de 270 millions d'hectolitres. Les exportations du secteur vitivinicole mondial représentent 94% des parts de marché en 2007 pour un chiffre d'affaire avoisinant les 52 milliards d'euros (OIV, 2008).

2.2 Lutte actuelle

Historiquement, le soufre est le premier fongicide agissant contre l'oïdium, par son rôle compétitif de l'oxygène dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Tweedy et Turner, 1966). Son mode d'action multi-sites, son faible coût et son efficacité font que le soufre est encore largement employé sous différentes formes (soufre mouillable ou pour poudrage) dans les plans de traitement. Le milieu du XX^e siècle a vu l'apparition du premier fongicide organique de contact anti-oïdium inhibant la phosphorylation oxydative mitochondriale (dinocap). Les benzimidazoles et les triazoles/pyrimidines sont respectivement des inhibiteurs de la biosynthèse de la β -tubuline et de la C₁₄ déméthylase, enzyme de la biosynthèse des stérols. L'utilisation de ces premiers fongicides systémiques unisites a conduit à l'apparition de phénomènes de résistance dans les populations fongiques. Plus récemment, d'autres fongicides ont été développés tels que les inhibiteurs du cytochrome b mitochondrial (Quinone outside Inhibitors, QoI). Devant l'apparition généralisée de résistance à certains fongicides unisites (Steva et Clerjeau, 1990; Pezet et Bolay, 1992; Gubler *et al.*, 1996; Erickson et Wilcox, 1997, Savocchia *et al.*, 2004), de nouvelles molécules dites "naturelles" sont arrivées sur le marché comme inducteur de défense de la plante (Stifénia®, Bion®, Milsana®). Les lactoferrines et la production de radicaux libres après exposition de lait à la lumière naturelle, ont un effet toxique sur les structures fongiques d'*E. necator* (Crisp, 2006). L'application d'huile végétale a également montré une efficacité contre l'oïdium (Martin *et al.*, 2005) mais reste tributaire des conditions météorologiques pour éviter toute phytotoxicité.

La lutte contre l'oïdium par l'application de modèle de prévision des risques cherche à intégrer de nombreux paramètres déterminants, afin de mieux positionner les fongicides en fonction de la pression de la maladie. Si les premiers modèles se basaient essentiellement sur les paramètres climatiques (Sall, 1980; Chellemi et Marois, 1991; Gubler *et al.*, 1999), de nouveaux modèles tentent d'intégrer le développement du

pathogène en parallèle à la croissance de l'hôte et à la sensibilité de ses organes (Calonnec *et al.*, 2005 et 2008).

2.3 Réceptivité de l'hôte

La résistance ontogénique est présumée constitutive du développement des tissus de la vigne (Corio-Costet, 2007). Elle apparaît donc graduellement avec l'âge des feuilles (Doster et Schnathorst, 1985a) et la maturité des baies, supposant l'accumulation de composés liés à l'arrêt de développement du pathogène. Toutefois, le comportement du pathogène dépend essentiellement du niveau de sensibilité de l'hôte et de son aptitude à mettre en œuvre ses réactions de défense. Tous les cépages issus des espèces *Vitis vinifera* et *Vitis labrusca* sont considérés comme sensibles à la maladie (Boubals, 1961; Galet, 1977). Plusieurs gènes mineurs de résistance, assemblés sous différentes combinaisons parmi les cépages cultivés, expliqueraient la variabilité des niveaux de résistance, observée au sein de *V. vinifera* (Li *et al.*, 1993). Selon différents auteurs (Li *et al.*, 1993; Eibach, 1994; Doster et Schnathorst, 1985b), la sensibilité au pathogène observée sur feuilles et sur grappes d'un même cépage serait étroitement corrélée.

La majorité des espèces et genres différents de *V. vinifera* expriment une résistance à *E. necator*, tels que *Parthenocissus quinquefolia*, *Ampelopsis*, *Cissus* et *V. rotundifolia*. Selon Staudt (1997), *V. candicans* et *V. rotundifolia* présentent une résistance pour chaque accession testée. L'existence de telles espèces constitue une opportunité pour l'étude des mécanismes de résistance.

2.4 Sélection de cépages résistants

Malgré une efficacité reconnue et nécessaire dans la protection des végétaux, l'application des traitements phytosanitaires pose des problèmes d'innocuité en matière d'environnement (Wightwick *et al.*, 2008) et de santé humaine (Baldi et Lebaillly, 2007; Bjorling-Poulsen *et al.*, 2008). L'amélioration variétale constitue une alternative à la stratégie de protection chimique du vignoble, par la sélection de cépages résistants aux maladies fongiques, assistée par marqueurs. Elle nécessite cependant la caractérisation des sources de résistance existant au sein des Vitacées. De plus, l'introgession de caractère de résistance, notamment identifié chez les *Vitis* américains, ne doit pas altérer les qualités agronomiques et gustatives des *V. vinifera* cultivés. L'amélioration génétique de la vigne se heurte à la taille de la plante, son long temps de régénération et l'hétérozygotie clonale résultant du manque d'innovation variétale imposée par la législation de certains pays. La sélection empirique se base sur la notation du phénotype d'individus, résultant de l'expression du génotype dans un milieu donné. Du fait d'interactions entre le génotype et son environnement, il est important de caractériser le déterminisme génétique du caractère d'intérêt, indépendamment de son expression.

C'est pourquoi l'utilisation de marqueurs moléculaires, flanquant des gènes d'intérêt, optimise les stratégies de sélection et permet la construction de génotypes accumulant des gènes favorables (Gallais, 1994). La sélection assistée par marqueurs moléculaires permet de lire le génotype à travers l'expression du phénotype, en supposant une liaison assez forte entre les marqueurs et les gènes d'intérêts.

L'utilisation la plus remarquable des marqueurs moléculaires repose sur l'élaboration de carte génétique, dont la saturation en marqueurs affiche autant de groupe de liaisons que de chromosomes de l'espèce analysée. Elles constituent le support de la décomposition des caractères complexes en leurs composantes discrètes ("QTL": Quantitative Trait Loci) et l'estimation de la liaison entre marqueur et QTL pour son utilisation en sélection assistée par marqueurs (Plomion, 2004). L'établissement d'une carte génétique implique une population en ségrégation, où chaque individu est typé pour les différents marqueurs moléculaires polymorphes.

Cependant, les caractères d'intérêt agronomique tels que la résistance aux maladies ne sont pas contrôlés par un gène majeur unique, mais résultent le plus souvent de l'action de plusieurs gènes à effets variables (Shrimpton et Robertson, 1988). Un caractère à déterminisme génétique quantitatif implique l'intervention de nombreux gènes, ségrégant pour donner une distribution continue du phénotype.

La détection de QTL se fonde sur la recherche de déséquilibre de liaison (liaison physique) entre les allèles au locus marqueur et les allèles au locus contrôlant le caractère quantitatif. Deux méthodes de détection de QTL sont généralement employées: le modèle utilisant les marqueurs individuellement et le modèle basé sur l'utilisation de marqueurs adjacents. Le premier modèle consiste à rechercher une association entre chaque marqueur pris individuellement et le caractère quantitatif, par une analyse de variance ou son équivalent non-paramétrique: le test de Kruskal-Wallis. Si les moyennes des classes génotypiques diffèrent significativement, le marqueur est vraisemblablement lié à une région chromosomique impliquée dans la variation du caractère. L'intérêt de cette méthode réside dans sa simplicité car elle ne nécessite pas de cartes génétiques. Toutefois, sa capacité de détection de QTL est d'autant plus limitée que la densité de marqueurs est faible. Aussi, la méthode de cartographie par intervalle (Lander et Botstein, 1989), basée sur le maximum de vraisemblance de présence d'un QTL en tout point du génome compris entre deux marqueurs bordants, accroît la puissance de détection et la précision de localisation de QTL.

L'identification de régions de génome associées à la résistance aux maladies fongiques ont été ainsi mis en évidence à partir de différents hybrides issus de différentes espèces de *Vitis* (Brown *et al.*, 1999; Dalbo *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2004; Welter *et al.*, 2007). Merdinoglu *et al.* (2003) ont mis en évidence un QTL de résistance à *Plasmopara viticola* issu de *Muscadinia rotundifolia*. Ce QTL nommé *Rpv1*, est situé sur le groupe de

liaison 12 et explique 83% de la variation génétique du caractère. Un second QTL de résistance au mildiou (*Rpv2*) a également été identifié sur le groupe de liaison 18, issu d'un croisement entre un hybride de première génération de rétrocroisement [*M. rotundifolia* x *V. vinifera*] et le parent récurrent *V. vinifera*. De plus, les auteurs suggèrent que *Rpv1* est étroitement lié à *Run1*, gène dominant conférant la résistance à l'oïdium (Pauquet *et al.*, 2001). En affinant la position de *Run1* sur le chromosome 12, Barker *et al.* (2005) ont trouvé deux familles de séquence de gènes RGA (Resistance Gene Analogue). De tels gènes conduisent à la traduction de protéines de type anticorps de garde et activateurs des mécanismes de défense, qui englobent les processus de perception du pathogène jusqu'à la réaction d'hypersensibilité (Corio-Costet, 2007). De nombreux RGA ont été identifiés dans le génome de la vigne (Di Gaspero *et al.*, 2007). La disponibilité de séquence de RGA combinée à la détection de QTL constitue un outil d'élaboration de marqueurs étroitement liés au loci gouvernant le caractère de résistance aux maladies fongiques de la vigne.

3 Interaction hôte-pathogène

Les plantes sont constamment exposées à une large gamme de microorganismes, mais seule une faible proportion d'entre eux sont capables de causer une maladie. Les pathogènes obligatoires stricts constituent le plus haut niveau de spécialisation observée dans une interaction plante-champignon (Knogge, 1996), puisque le maintien de la plante hôte vivante est une condition absolue à la réalisation intégrale du cycle biologique du pathogène (de la germination jusqu'à la sporulation).

Les mécanismes de défense induits suite à la reconnaissance de pathogènes constituent communément le niveau de résistance basale des plantes. L'établissement d'une infection nécessite donc de contourner ou de supprimer les défenses et de reprogrammer la cellule-hôte afin d'établir une interaction compatible. L'établissement d'une relation compatible entre un pathogène et son hôte suppose un subtil équilibre entre l'inactivation des défenses et la reprogrammation du transcriptome de l'hôte afin de permettre le prélèvement de substances nutritives pour le développement du pathogène, tout en maintenant la cellule hôte en vie.

3.1 Processus infectieux fongique

Les pathogènes fongiques doivent surpasser de nombreux obstacles avant de pouvoir infecter la plante hôte. La plupart des microorganismes pathogènes des plantes doivent pénétrer l'apoplaste (cuticule et paroi cellulaire) de l'hôte, afin d'accéder aux nutriments intracellulaires (Hückelhoven, 2007). Différentes aptitudes à coloniser la plante hôte s'observent chez les pathogènes: la pénétration par voie naturelle (agent des mildious et

des rouilles), par une blessure (bactéries, pourritures) ou injecté directement par un vecteur (virus). Cependant, de nombreux pathogènes fongiques disposent de mécanismes actifs, basés sur des activités enzymatiques et/ou mécaniques pour accéder aux cellules hôte. L'infection de l'hôte implique un processus chronologique de différenciations morphologiques, initiées dès le contact d'une spore avec les tissus végétaux.

L'élaboration d'un tube germinatif, immédiatement après le dépôt d'une spore à la surface de l'hôte, joue un rôle crucial dans la pathogénèse. La première fonction est d'assurer l'adhérence de la particule fongique à la surface de l'hôte par la sécrétion active de mucilages. Un matériel extracellulaire amorphe apparaît sous le premier tube germinatif de *Blumeria graminis*, qui coïncide avec l'observation de l'adhérence (Carver *et al.*, 1995). Une fonction proposée pour le tube germinatif reste axée sur la reconnaissance des caractéristiques de surface (Carver et Ingerson, 1987), engageant le "signalling" intracellulaire nécessaire à l'élongation du tube germinatif ou la différenciation en appressorium.

La formation d'appressoria intervient en réponse aux caractéristiques du substrat. L'hydrophobicité, la présence de cellulose (Carver *et al.*, 1996) ou l'application de monomères de cutine préalablement extraits (Francis *et al.*, 1996) participent à la formation d'appressoria de *B. graminis* sur des substrats artificiels. L'hydrophobicité de surface semble stimuler la différenciation en appressoria chez *Erysiphe pisi* (Carver *et al.*, 1996). La présence d'une matrice de matériel extracellulaire libérée par les structures infectieuses fongiques est également évoquée dans le processus de différenciation des appressoria. En plus d'être impliquées dans l'adhérence des structures fongiques, des enzymes hydrolysent la surface de l'hôte, dont les produits de dégradation constituent un signal menant à la différenciation de l'appressorium.

La question de la pénétration de la cellule hôte reste débattue, s'articulant autour d'une digestion enzymatique des barrières primaires et/ou une poussée mécanique générée par l'appressorium. Une combinaison des deux procédés a été proposée pour la première fois par Edwards et Allen (1970). Fric et Wolf (1994) ont identifié un large spectre d'activités hydrolytiques dans des extraits de conidies germées et non-germées de *B. graminis*, incluant des estérases, cutinases, lipases, phosphatases, protéases, glucanases et amylases. Le bagage enzymatique fongique permettant la dégradation de la paroi cellulaire inclut des cellulases, polygalacturonases, xylanases et protéinases (Annis et Goodwin, 1997). Ehrlich et Ehrlich (1971) ont observé une abondance d'estérases et de phosphatases dans les appressoria, les hyphes de pénétration et les haustoria, indiquant un rôle clé de ces enzymes dans le processus de pénétration, mais également leur implication dans les échanges de substances entre l'hôte et le parasite. Par conséquent, la dégradation enzymatique des différentes couches de surface de l'hôte facilite la

pénétration du pathogène. Toutefois, les appressoria des oïdiums restent hyalins et il est probable que la pression de turgescence développée au sein d'un appressorium soit suffisante pour percer physiquement la cuticule (Green *et al.*, 2002). L'appressorium mélanisé de *Magnapotha grisea* développe une pression de turgescence de 8 MPa (Howard *et al.*, 1991) tandis qu'une pression de 2.1 à 4.1 MPa a été reportée dans les appressoria de *B. graminis* (Pryce-Jones *et al.*, 1999). Pour maintenir une telle pression, Howard *et al.* (1991) mentionne la nécessité d'une adhérence parfaite à l'interface entre le pathogène et l'hôte, par la production d'un anneau de matériel extracellulaire. Ce type de matériel aux propriétés adhésives a été localisé au niveau du site de pénétration chez *B. graminis* (Carver *et al.*, 1995) et chez *E. necator* (Rumbolz *et al.*, 2000).

Une fois la cuticule et la paroi cellulaire franchies, l'hyphe de pénétration d'*E. necator* s'invagine dans la membrane plasmique de la cellule hôte et forme une structure spécialisée, permettant l'absorption. L'haustorium comprend un cytoplasme, une membrane et une paroi, dont la composition reste similaire à celle d'une paroi cellulaire fongique classique (chitine et polysaccharides) (Green *et al.*, 1995). Durant la formation de l'haustorium, au sein de la cellule épidermique, la membrane plasmique et la paroi de l'haustorium restent séparées par une matrice extra-haustoriale, supposée jouer un rôle protecteur pour le pathogène contre la mobilisation des défenses de l'hôte (Hajlaoui *et al.*, 1991). La membrane plasmique invaginée par le corps de l'haustorium est appelée membrane extra-haustoriale. Ses caractéristiques structurales et sa composition diffèrent de la membrane plasmique d'une cellule non infectée (Heintz et Blaich, 1990). L'altération de ses propriétés fonctionnelles peuvent se révéler bénéfique pour l'acquisition des nutriments par le pathogène (Perfect et Green, 2001). Mendgen et Naas (1988) propose un modèle de fonctionnement de l'haustorium basé sur les caractéristiques de la membrane extra-haustoriale. Une dépolarisation de celle-ci engendre un flux de solutés du cytoplasme de la cellule hôte vers la matrice extra-haustoriale. Un gradient électrochimique le long de la membrane haustoriale est établi par une activité H^+ -ATPase, qui fournit l'énergie nécessaire au prélèvement d'hexoses et des acides aminés, par des transporteurs spécifiques. Au sein du corps de l'haustorium, une mannitol déshydrogénase convertit le fructose en mannitol, fournissant non seulement une source carbonée inutilisable par l'hôte mais également un facteur de suppression des réponses de la plante hôte. Les travaux de Hayes (2006) indiquent que l'infection mène à une modification de l'expression de gènes de l'hôte spécifiques au métabolisme glucidique et sa translocation, accroissant la disponibilité d'hexoses pour la croissance du pathogène. Toutefois, il reste à démontrer si ces changements d'expression de gènes de l'hôte sont directement imposés par le pathogène ou sont une conséquence de la colonisation fongique.

L'établissement d'une interaction compatible s'observe par l'émergence d'un hyphes primaire chez *E. necator* (Rumbolz *et al.*, 2000). Le développement du pathogène se poursuit par la colonisation d'autres cellules hôte, aboutissant à la croissance du réseau mycélien et à la conidiogénèse.

3.2 Réactions de défense de l'hôte

3.2.1 Reconnaissance du pathogène

Dans l'interaction hôte-pathogène, la reconnaissance du pathogène par l'hôte s'opère par la perception de molécules liées au pathogène ou par la surveillance de son intégrité cellulaire (Hückelhoven, 2007). La progression du pathogène au sein de l'apoplaste végétal et la sécrétion enzymatique déclenchent des réactions de défense basales, par la reconnaissance de motifs moléculaires associés au pathogène (PAMPs: Pathogen Associated Molecular Pattern) (Jones et Dangl, 2006). Par exemple, l'endopolygalacturonase 1 de *Botrytis cinerea* agit comme éliciteur indépendamment de son activité enzymatique (Poinssot *et al.*, 2003). Des éliciteurs non spécifiques, dérivés de la paroi cellulaire fongique tels que les octamères de chitine, sont inducteurs de l'alcalinisation du compartiment apoplastique de feuilles d'orge infectées par *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Felle *et al.*, 2004). Toutefois, la nature ubiquiste des éliciteurs ont vraisemblablement forcé les plantes à contrôler leur défense afin de se prémunir de réactions intempestives envers des microorganismes non pathogènes présents dans la phyllosphère, tels que les endophytes (Hückelhoven, 2007). Les pathogènes fongiques ont donc développé des mécanismes de suppression de résistance basale afin d'établir la compatibilité. Si de nombreuses études existent sur les mécanismes physiologiques impliqués dans les réactions de défense post-infection, peu d'informations sont disponibles sur les événements précoces de reconnaissance hôte-pathogène, engendrant l'activation de l'expression du système de défense (Di Gaspero et Cipriani, 2002). Les facteurs contribuant au caractère de résistance d'un pathogène fongique peuvent être constitutifs (préformé avant tout événement d'infection) ou induits.

3.2.2 Facteurs de résistance constitutifs

Les éléments constitutifs liés aux mécanismes de défense passive, incluent des barrières anatomiques ou morphologiques à la pénétration du pathogène (Gabler *et al.*, 2003) mais également des composés fongitoxiques présents à la surface de l'hôte. Dans un premier temps, le pathogène doit être capable de percer les défenses passives de l'hôte, matérialisées par la cuticule, composée de cires cuticulaires, de cutine et de microfibrilles de polysaccharides (Wang *et al.*, 2000) (Figure 6).

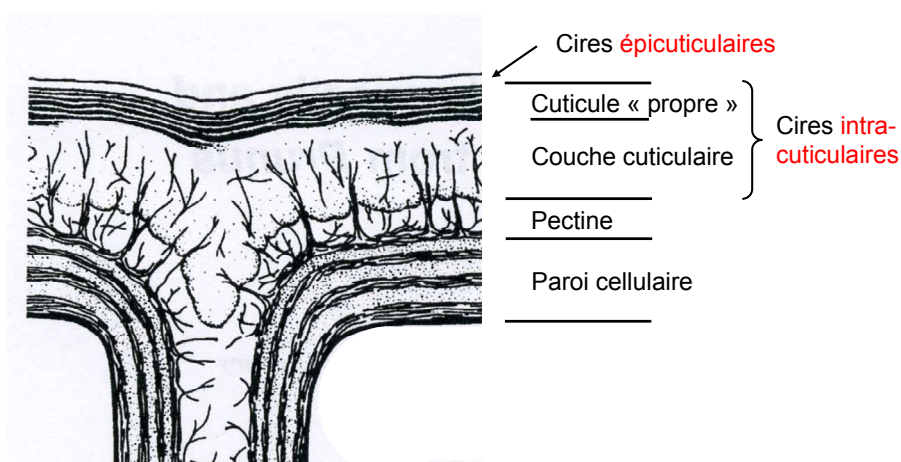


Figure 6 Coupe transversale schématique de la partie supérieure de l'épiderme végétal (d'après Jeffree, 1986).

3.2.2.1 Cires cuticulaires

L'interface entre les tissus végétaux et l'environnement est formée par une enveloppe extracellulaire protectrice et imperméable dû à la présence d'une couche cireuse. La synthèse de ces matériaux superficiels est réalisée au sein des cellules épidermiques, assise externe des tissus végétaux (Riederer et Müller, 2006). Les lipides constitutifs des cires diffèrent par leur composition chimique de ceux des tissus internes et des organelles cellulaires d'une même plante (Dominguez et Heredia, 1998). Les cires cuticulaires sont un enchevêtrement complexe de composés organiques aliphatiques qui diffèrent dans le nombre, l'abondance relative et la distribution de chaque classe de constituants. Ces composés aliphatiques se présentent sous forme de chaînes saturées, variant de 20 à 34 atomes de carbones, dérivées d'acides gras à très longue chaîne (Jetter et Kunst, 2008). Les cires cuticulaires peuvent inclure des composés cycliques et aromatiques tels que des triterpénoïdes, alcaloïdes, phenylpropanoïdes et flavonoïdes (Jetter et Kunst, 2008). La spécificité des cires cuticulaires entre les espèces végétales repose sur la composition des classes de composés chimiques et la distribution des longueurs de chaînes carbonées (Jetter *et al.*, 2006). Cette diversité s'établit au cours de la biosynthèse des cires au sein des cellules épidermiques, à travers deux voies métaboliques : l'élongation des précurseurs d'acides gras et leur transformation en composés cireux par le greffage de groupes fonctionnels (Kunst *et al.*, 2006). Les principales classes de composés aliphatiques présentes dans les cires cuticulaires sont les alcanes (absence de groupement fonctionnel), aldéhydes, alcools primaires, acides gras, esters (présence d'un groupement fonctionnel primaire). Des composés avec des groupes fonctionnels secondaires (cétones, alcools secondaires, diols) apparaissent dans les cires de certaines espèces sous forme d'isomères ou de longueur de chaîne carbonée similaire (Jetter et Kunst, 2008). La distribution de ces différentes classes de composés peut être homogène ou être dominée par une seule famille chimique (Tableau 1).

Tableau 1 Distribution relative (%) des classes chimiques de cires cuticulaires de diverses espèces végétales.

	<i>Prunus laurocerasus</i> L.	<i>Nepenthes alata</i> Blanco	<i>Pisum sativum</i> Advanta	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Ligustrum vulgare</i>	<i>Rosa canina</i>
Alcanes	72	2	39.7	0.9	12	52
Alcools	9	18	44.2	75.8	3	23
Aldéhydes	1	62	4.4	6.2	1	-
Acides gras	2	6	0.2	0.4	4	-
Esters	-	6	5.6	11.5	-	12
Terpénoïdes	11	1	-	-	66	1
Non identifiés	5	5	5.9	5.3	13	-
Référence	Jetter <i>et al.</i> (2000)	Riedel <i>et al.</i> (2003)	Gniwotta <i>et al.</i> (2005)	Zabka <i>et al.</i> (2008)	Buschhaus <i>et al.</i> (2007)	Buschhaus <i>et al.</i> (2007)

La quantité de cires cuticulaires produite est étroitement liée aux conditions environnementales de croissance de la plante, notamment l'exposition aux UV (Jenks et Ashworth, 1999), tandis que la composition chimique reste indépendante des facteurs environnementaux. Par exemple, les quantités de cires cuticulaires de feuilles de Funkies (*Hosta* sp.) varient en fonction de la saison quelque soit le génotype étudié (Jenks *et al.*, 2002).

Les caractéristiques communes des cires cuticulaires des végétaux conjuguent un haut degré de cristallisation et un fort caractère hydrophobe, couplés à une faible réactivité chimique. Cette structure cireuse organique confère un important rôle de barrière physiologique à la surface des organes des plantes (Dominguez et Heredia, 1998). Elles contribuent à la résistance liée à une large gamme de stress biotiques (pathogènes fongiques, insectes phytophages) et abiotiques (sécheresse, radiation solaire, gel, abrasion mécanique et influences anthropogéniques telles que les pluies acides, l'ozone ou encore l'absorption foliaire de xénobiotiques) (Jenks et Ashworth, 1999). Selon ces mêmes auteurs, la surface cireuse peut entraver l'établissement des infections fongiques selon plusieurs hypothèses. Les cires cuticulaires peuvent constituer une barrière physique à la pénétration. Par exemple, l'épaisseur de la cuticule et la teneur en cires sont des critères morphologiques associés à la résistance de la baie de raisin à *Botrytis cinerea* (Glaber *et al.*, 2003). Le motif de cristallisation des cires épicuticulaires peut également influencer la sensibilité de la plante. Les baies de *Vitis vinifera* en contact l'une avec l'autre synthétisent faiblement des cristaux de cires, et présentent 64% plus d'infection à *Botrytis cinerea* que lorsqu'elles ne sont plus en contact direct (Marois *et al.*, 1986). Yang et Ellingbo (1972) rapporte qu'*E. graminis* produit plus d'appressoria malformés sur des mutants d'orge exprimant des motifs cristallins cireux altérés. L'échec d'une tentative d'infection peut également être attribué à la présence de composés

chimiques antifongiques associés à la couche de surface. Selon Kolattukudy (1985), le réseau de cutine joue un rôle physique tandis que les cires cuticulaires exercent une activité chimique dans l'inhibition de la pénétration fongique. De tels composés exprimés à la surface foliaire sont particulièrement importants dans la protection de la plante, puisque les spores fongiques doivent nécessairement être en contact étroit avec la surface foliaire avant d'initier le processus invasif (García *et al.*, 1997). Quelques composés antifongiques ont été identifiés dans les cires épicuticulaires de différentes espèces (Jenks et Ashworth, 1999). A l'inverse, d'autres composés à longue chaîne carbonées sont responsables du développement fongique par la différenciation en appressorium chez *Magnaporthe grisea* (Gilbert *et al.*, 1996) et chez *Colletotrichum gloeosporioides* (Podila *et al.*, 1993). Enfin, l'hydrophobicité de surface peut influencer l'établissement du pathogène en modifiant le taux d'hygrométrie nécessaire aux premiers stades de développement du champignon. La germination des pathogènes, nécessitant de l'eau libre (mildious) ou des forts taux d'humidités (oïdiums) est conditionnée par les propriétés de lessivage d'une surface. La couche de cires rend potentiellement la surface imperméable, en évitant la stagnation de l'eau due aux précipitations. La mouillabilité de la surface foliaire est étroitement liée à la composition chimique des cires cuticulaires, notamment la proportion de certains constituants hydrophobes (alcanes, alcools secondaires, esters).

3.2.2.2 Cutine

La cutine, composé structural de la cuticule, se définit comme un bio-polyester d'acides gras hydroxylés et époxy-hydroxylés inter-estérifiés, dont la longueur de chaîne carbonée est de 16 à 18 atomes de carbones. Le polymère de cutine est scellé dans une couche de matériel hydrophobe, les cires intracuticulaires, et surmonté d'une couche de cires épicuticulaires. Les monomères constitutifs de la cutine en C₁₆ et en C₁₈ sont respectivement synthétisés à partir de l'acide palmitique (16:0) et de l'acide oléique (18:1), dans les cellules épidermiques (Nawrath, 2002). De manière similaire aux cires cuticulaires, le complexe de cutine peut présenter une entrave physique et/ou chimique à la pénétration d'un pathogène fongique. L'épaisseur de la cutine peut constituer un obstacle à l'accès à la cellule hôte. *Venturia inaequalis* pénètre plus facilement la cutine de jeunes feuilles que celle de feuilles âgées, dont la cutine est plus épaisse (Nicholson *et al.*, 1973). Cette observation indique que la cutine ne peut constituer une simple barrière physique pour le pathogène, mais évolue dans le temps par des modifications morphologiques et chimiques des constituants (Gevens et Nicholson, 2000). La cutine peut également contenir des composés fongitoxiques tels que les isomères α - et β -duvatriene-1-diol, dont la concentration dans la cutine de tabac augmente parallèlement avec l'âge des feuilles et se révèle toxique pour les conidies de *Peronospora tabacina*

(Rao *et al.*, 1987). Les pathogènes fongiques secrètent des cutinases afin d'hydrolyser le polyester de cutine. Certains monomères de cutine libérés peuvent soit être fongitoxiques (Wang *et al.*, 2000), soit être activateurs de réaction de défense de l'hôte (Schweizer *et al.*, 1996a et b; Chassot et Métraux, 2005).

3.2.3 Facteurs de résistance induits

Les plantes ont la capacité de répondre à un stimulus biotique ou abiotique, par l'induction de différents mécanismes de défense. Plusieurs stratégies sont décrites par lesquelles l'hôte peut protéger activement sa paroi cellulaire de l'infection fongique (Hückelhoven, 2007), à savoir l'inhibition des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire, les modifications structurales de la paroi cellulaire après une tentative de pénétration, ou encore la libération de composés antifongiques.

Le **renforcement de la paroi cellulaire** de l'hôte repose sur la synthèse de barrières physiques complémentaires, mises en place afin de circonscrire le site infectieux. La lignification et la subérisation rendent la paroi cellulaire plus résistante à la pression mécanique appliquée par l'appressorium lors du processus de pénétration. En complément, une paroi cellulaire lignifiée est moins facilement dégradable et impose au pathogène une détoxification des produits de dégradation enzymatique. Les papilles, définies comme un dépôt de matériel de paroi cellulaire aux sites d'infection, qui diffèrent chimiquement et mécaniquement des caractéristiques d'une paroi cellulaire normale, sont associées à la présence de composés phénoliques (Heintz et Blaich, 1990) impliquant des peroxydases dans le phénomène de subérisation (Kolattukudy *et al.*, 1989; Heintz et Blaich, 1990). Les papilles sont généralement observées sur la face interne de la paroi cellulaire (Zeyen *et al.*, 1979), bloquant le développement de l'haustorium. La présence d'H₂O₂ dans les papilles constitue un marqueur biochimique des cellules d'orge infectées par *B. graminis*. La rapidité et la compaction de ces dépôts sont cruciaux pour le succès de la défense. Si la callose constitue une barrière physique induite à la pénétration des zoospores de *Plasmopara viticola*, elle a également été observée autour de papilles et du cou de l'haustorium d'*E. necator*. Cependant, ces dépôts de callose ne semblent pas intervenir dans les premières réactions de défense (Heintz et Blaich, 1990).

La **réaction d'hypersensibilité** correspond à la mort des cellules voisines du site d'infection, confinant le pathogène dans une aire de « suicide localisé » où l'interaction ne peut plus s'établir. Cette réaction de défense extrême implique la participation d'espèces réactives d'oxygènes (ROS: *Reactive Oxygen Species*), de PR-protéines (*Pathogenesis Related*) et de phytoalexines. Un stress oxydatif constitue également une réponse à la pénétration fongique dans la paroi cellulaire. Une production rapide de ROS peut être histochimiquement détectée au sites infectieux (Thordal-Christensen *et al.*,

1997) et participe au renforcement de la paroi végétale par oxydation et insolubilisation des composés structuraux (Tenhaken *et al.*, 1995). Ces ROS sont directement toxiques envers les micro-organismes, mais également envers les cellules végétales, expliquant leur implication dans la nécrotisation cellulaire permettant la restriction du pathogène. En outre, les ROS participent aux premières étapes de la biosynthèse de l'acide jasmonique, par induction de lipoxygénases qui catalysent l'oxygénation de l'acide linoléique. Le dérivé de l'acide jasmonique, le méthyljasmonate, est connu pour son rôle dans l'induction de la biosynthèse des stilbènes (Krisa *et al.*, 1999).

Les PR-protéines (Pathogenesis Related) sont sécrétées au sein de la paroi cellulaire de l'hôte et affecte l'intégrité de celle du champignon. Jacobs *et al.* (1999) ont isolé des séquences d'ADNc, codant pour différentes PR-protéines, telles que des chitinases (PR-3), β -1,3-glucanases (PR-2) et protéines type thaumatine (PR-5), exprimées en réponse à une infection à *E. necator*. Ces mêmes auteurs ont constaté que l'accroissement de l'activité hydrolytique de la vigne était lié à la sévérité de l'infection. Toutefois, cette réaction est insuffisante pour inhiber le pathogène dans le cas de cultivars de *V. vinifera* sensibles, et ne présente pas de systémie vers les tissus non infectés.

Un autre mécanisme de défense repose sur la synthèse de métabolites secondaires tels que **les phytoalexines**, dont l'activité fongitoxique a été largement étudiée (Hain *et al.*, 1993). La vigne a la capacité de produire des composés phénoliques de faible poids moléculaire, s'articulant autour d'un précurseur: le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) (Langcake, 1981) (Figure 7).

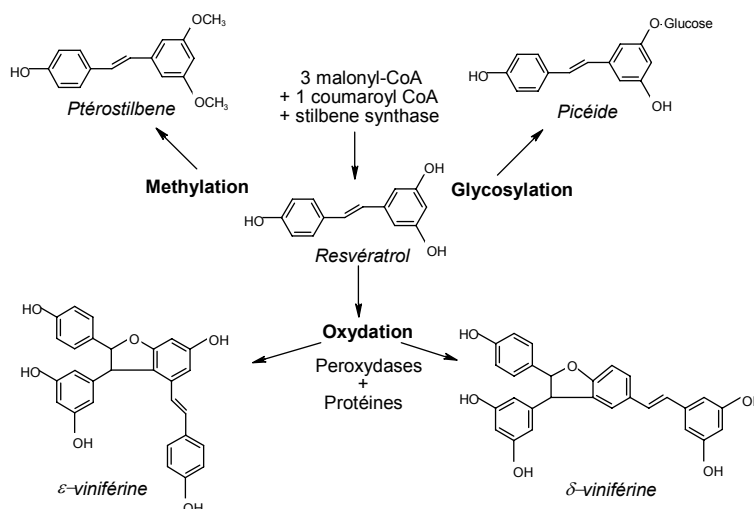


Figure 7 Voies de biosynthèse du resvératrol et de ses dérivés (d'après Pezet *et al.*, 2003).

Les propriétés antifongiques de ces composés ont été évaluée *in vitro* sur *Botrytis cinerea* (Hoos et Blaich, 1990; Pezet et Pont, 1990) et *Plasmopara viticola* (Pezet *et al.*, 2004a). Certaines études ont mis en évidence une corrélation entre la synthèse de ces molécules

et le niveau de sensibilité à certains pathogènes, chez différents cultivars de vigne (Derck et Creasy, 1989; Pezet *et al.*, 2004b). En complément, les phytoalexines sont également capables de stimuler les mécanismes de renforcement de la paroi cellulaire. Des mutants *mlo* d'orge apparaissent résistants à la pénétration d'*E. graminis* et surproduisent du p-coumaroyl-hydroxyagmatine, composé antifongique inhibant la formation d'haustoria *in vivo* (Von Röpenack *et al.*, 1998).

Les gènes contrôlant la synthèse des phytoalexines sont largement répandus au sein des espèces de *Vitis*, même si les espèces résistantes aux maladies induisent plus rapidement et en plus grande quantité cette réaction de défense. Le transfert des gènes de la stilbène synthase de *Vitis* dans d'autres espèces végétales a accru le niveau de résistance aux pathogènes. Liang *et al.* (2000) ont obtenu des plantules de blé résistantes à l'oïdium, après transfert du gène de la stilbène synthase *Vst1*. La surexpression de la stilbène synthase, menant à une accumulation de resvératrol, améliore la résistance aux pathogènes fongiques chez le tabac (Hain *et al.*, 1993), l'orge et le blé (Leckband et Lörz, 1998), la pomme (Szankowski *et al.*, 2003) et la papaye (Zhu *et al.*, 2004). En plus de leur intérêt en phytopathologie, le resvératrol et ses dérivés oxydés (viniférines), présentent un intérêt pharmaceutique. Les propriétés antioxydantes du resvératrol expliquent le nombre d'études cherchant à introgresser ou à amplifier la quantité naturelle de ce composé, dans un but de création d'aliments à but thérapeutique ("alicament") contre les maladies cardiovasculaires et le cancer (Jang *et al.*, 1997).

4 Objectifs de ce travail de recherche

Le développement de programme de sélection de cépages résistants aux pathogènes fongiques s'inscrit dans un cadre conjoncturel de lutte raisonnée des maladies de la vigne. Le *screening* des sources de résistance et leur évaluation dans un fond génétique acceptable en termes d'exigences agronomiques et de commercialisation de produits finis, nécessitent la disponibilité de marqueurs pertinents pour une sélection précoce des génotypes d'intérêt. La détermination de caractères phénotypiques liés à la résistance à *E. necator* nécessite une meilleure compréhension de l'interaction hôte-pathogène. Le développement d'*E. necator* sur différentes espèces de vigne montrent une variabilité de la réponse de défense mise en jeu par l'hôte dès la reconnaissance du pathogène (Chapitre I).

L'absence d'étude relatant le rôle spécifique des cires cuticulaires et du polymère de cutine dans l'établissement de l'interaction *E. necator* – *V. vinifera*, légitime l'intérêt porté sur ces sujets de recherche. Ce travail a pour but de déterminer le caractère constitutif, induit, ou la combinaison des deux types de défenses de l'hôte, suite à une infection. Pour cela, la contribution dans le phénomène de résistance de chaque

compartiment cellulaire traversé par le pathogène jusqu'à son installation dans la cellule-hôte, est évaluée qualitativement et quantitativement (Chapitre II, III et IV).

La prise en compte des mécanismes infectieux d'*E. necator*, associés à la variabilité des caractères de résistance et de leur expression parmi les hôtes étudiés, sert à l'identification des facteurs de résistance naturelle de la vigne à l'oïdium, exploitables par le développement de marqueurs discriminants dans un programme de sélection (Chapitre V).

Matériel et Méthode

1 Matériel biologique

Des sarments issus des vignes du vignoble expérimental d'Agroscope Changins-Wädenswil ont été prélevés lors des opérations de taille, puis conservés en jauge dans du sable humide à une température de 4 à 8°C et 80% d'humidité relative. Une bouture "à deux yeux" est effectuée à partir du bois de sarment sectionné, permettant la rhizogénèse à partir de l'œil inférieur et le développement des organes aériens à partir de l'œil supérieur. Les boutures ont été désinfectées par immersion dans une solution d'oxyquinoléine (0.3% de Travacid) avant d'être placées en godets de tourbe compressée Fertilpot (Ø 8 cm). Le substrat de croissance est composé de Perlite et de terreau "spécial 3" (Brill) (50:50 v/v) afin d'assurer la division racinaire et l'hydratation des boutures.

La mise en végétation des boutures est réalisée dans une serre équipée d'une bâche chauffante (16 h de lumière, 24.5°C ± 0.5, 70% HR, éclairage: 200 W m⁻²; 8 h d'obscurité, 23°C ± 1, 70% HR). L'ombrage est activé dès 300 W m⁻² d'intensité lumineuse extérieure.

Lorsque le stade "5 feuilles développées" est atteint, la croissance des boutures est accélérée par une mise en culture hydroponique et adjonction d'engrais liquide (Wuxal à 0.1%, v/v). Après 2 mois de culture, les boutures sont repotées (Ø 12 cm) et 15 jours de culture supplémentaires permettent d'atteindre le stade "12-15 feuilles développées", adéquate pour les expérimentations.

L'ensemble des expérimentations concernant l'étude de l'interaction hôte-pathogène a été réalisée sur les feuilles de niveau d'insertion 4 et 5 depuis l'apex, provenant de jeunes plants cultivés en pot et de jeunes plants greffés. Les cépages étudiés ont été sélectionnés en vue d'avoir la gamme la plus large possible de comportement vis-à-vis d'une infection à *E. necator* (forte sensibilité jusqu'à résistance totale). Le Chasselas et *Vitis candicans* constituent respectivement les références "sensible" et "résistant" à l'oïdium dans les diverses études. Les diverses obtentions et croisements réalisés au sein du programme de sélection et d'amélioration de la vigne d'ACW (programme Interspécifique Recherche Agronomique Changins) ont été testés en vue de l'évaluation de leur potentiel en matière de résistance à l'oïdium (IRAC 1999 et 2292). D'autres cépages dont le niveau de résistance est connu dans la littérature et/ou noté au vignoble, ont également été retenus (*Vitis vinifera* cv Pinot Noir, *Muscadinia rotundifolia*).

L'inoculum d'*Erysiphe necator* est issu d'une population de conidies provenant de feuilles infectées de cépages sensibles (*Vitis vinifera* cultivars Chasselas et Pinot Noir), cultivés au sein du vignoble expérimental d'Agroscope Changins-Wädenswil. L'inoculum a été multiplié sur des plants de Chasselas (12-15 feuilles développées) tous les 14 jours, maintenus en cellule climatisée (24°C, 70% HR, 12 h de lumière).

2 Méthode d'inoculation et suivi des infections

Les feuilles détachées ont été désinfectées dans une solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 2.5% (m/v) durant 5 minutes puis rincées dans 3 bains successifs d'eau de robinet stérilisée. Dix disques foliaires ($\varnothing$ 0.8 cm) par cultivar sont excisés à l'emporte-pièce et placés dans une boîte de Petri contenant un milieu agar (10 g l⁻¹ agar technique n° 3, Oxoid) contenant 30 mg l⁻¹ de benzimidazole selon Cartolaro *et al.* (1990). La surface adaxiale des disques foliaires a été inoculée en balayant légèrement les chaînes conidiennes présentes sur des feuilles infectées. Les disques inoculés sont ensuite placés en chambre climatisée dans les mêmes conditions que celles nécessaires à la multiplication de l'inoculum (24°C, 70% HR, 12 h de lumière).

L'évaluation de la résistance à l'oïdium a été réalisée selon la description séquentielle des stades infectieux (Leinhos *et al.*, 1997). La comptabilisation du stade de développement atteint par chaque conidie observée sur un disque fournit différents critères qualifiant le couple pathogène/cultivar testé:

- Taux de germination = nombre de conidies ayant germé (dont la longueur du tube germinatif est supérieure à un tiers de la longueur de la conidie) par rapport au nombre total de conidies observées.

- Taux de formation d'appressoria = nombre de conidies ayant formé un appressorium par rapport au nombre total de conidies observées.

- Taux de formation d'haustoria fonctionnels = nombre de conidies dont l'appressorium a généré un premier hyphe par rapport au nombre total de conidies observées. Il s'agit d'une mesure indirecte supposant que l'observation d'un hyphe primaire résulte de l'établissement préalable d'un haustorium fonctionnel au sein de la cellule infectée.

Une notation de l'infection se réalise à 10 jpi et tient compte de la densité de mycélium observable à la loupe binoculaire (grossissement x25) ainsi que l'importance de la sporulation selon:

- l'intensité, notée de 0 (absente) à 3 (abondante),
- la surface de la sporulation, notée de 0% (absence de conidiophores) à 100% (sporulation sur l'ensemble du disque foliaire).

Trois répétitions de 10 disques foliaires ont été effectuées par cultivar et par traitement. Les critères d'appréciation de la sensibilité à l'oïdium spécifiques à chaque étude, seront précisés dans les chapitres correspondants.

3 Microscopie

3.1 Microscopie optique

3.1.1 Visible

Les disques foliaires ont été fixés dans une solution éthanol:acide acétique glacial (3:1) jusqu'à décoloration, puis rincés dans de l'eau distillée (1 h), transférés dans une solution d'acide lactique:glycérol:eau (1:1:1, v/v/v) durant 12 h puis incubés 5 min dans une solution aqueuse de bleu d'aniline à 0.1% (w/v) ou dans une solution de bleu de trypan 0.1% (w/v) dans du lacto-glycérol.

3.1.2 Epifluorescence

Les disques foliaires infectés sont observés de 1 à 10 jpi après coloration au diéthanol selon la méthode de Leinhos *et al.* (1997). Pour cela, les échantillons sont placés face infectée contre une solution de 0.2% (v/v) de diéthanol (Uvitex 2B, Polysciences) dans un tampon de 0.1 M Tris/HCl pH 6.5 à l'obscurité entre 10 et 30 min en fonction du stade fongique à observer (le temps d'incubation est proportionnel à la quantité de masse fongique présente sur le disque foliaire). La visualisation s'effectue sur un microscope à fluorescence Leica DLMB (filtre A (UV) Leitz, excitation à 340 nm, émission à 380 nm, filtre stop LP 430 nm) et d'une caméra digitale (Leica DC100). L'acquisition et le traitement d'image est réalisé à l'aide du logiciel Leica IM500.

3.2 Microscopie électronique à balayage

Les disques foliaires infectés ($\varnothing$ 0.8 cm) sont fixés par des vapeurs de tétraoxyde d'osmium (solution aqueuse de 2% d' OsO_4 (w/v) et de 3% de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (w/v)) durant 4 h dans une enceinte close saturée en humidité, puis déshydratés par des bains d'acétone (20 min à 4°C) de concentration croissante (10, 30, 50, 70, 90, 100, 100% (v/v)), séchés avec du CO_2 selon la technique du point critique (Critical Point Dryer, Baltech) puis métallisés à l'or ou au platine (couche: 150 Å, gaz: argon, pression de travail: 6.10^{-2} mbar, temps d'évaporation: 150 sec, distance de travail: 50 mm, sur MED 010 de Bal-Tec). Les échantillons ont été observés sur un microscope à balayage Jeol JSM-6300F à 5 KV et une distance de travail de 15 mm.

3.3 Microscopie électronique à transmission

Les échantillons ont été préfixés dans une solution de glutaraldéhyde (3%) et paraformaldéhyde (2%) à 0.07 M et pH 7, à température ambiante durant 2 h. Trois lavages de 10 min dans un tampon phosphate (0.07 M, pH 7) ont été réalisés afin de supprimer le fixateur. Les échantillons ont été enrobés dans une goutte de solution aqueuse d'agarose à 2% et fixés dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1% dans un tampon phosphate à 0.07 M et pH 7, à température ambiante durant 1 h. Deux lavages de 10 min dans un tampon phosphate (0.07 M) ont permis d'éliminer le fixateur. Les échantillons ont été déshydratés par des bains d'éthanol (2 x 7 min) de concentration croissante (30, 50, 70, 95, 100% (3 x 30 min) v/v), le dernier bain étant constitué d'éthanol 100% couplé au LR White (London Resin Compagny Limited) (1:1) durant 60 min. L'étape d'infiltration des échantillons a été réalisée dans une solution de LR White pure durant une nuit à 4°C, suivi d'un dernier bain de 60 min dans cette même résine. La polymérisation a été effectuée durant 24 h à 60°C. La coloration des préparations semi-fines, coupés au microtome Reichert-Jung Ultracut E, a été effectuée par flottaison (10 sec) sur une solution aqueuse à 50°C (réunion d'une solution aqueuse à 1% de bleu de méthylène et d'une solution aqueuse d'azur II à 1% contenant 1% de tétraborate de sodium). La coloration des préparations fines a été réalisée par deux bains successifs d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyl (2%) durant 15 min, puis d'une solution de citrate de plomb selon Reynolds (1963) durant 5 min. Entre et à la fin de chaque étape de coloration, les préparations ont été rincées à l'eau bidistillée et séchées. Les observations ont été réalisées sur un microscope électronique à transmission Philips CM10, équipé d'une caméra Megaview II.

4 Analyse qualitatives et quantitatives de phytoalexines stilbéniques

4.1 Extraction et purification des stilbènes

La picéide (3-O- β -D-glucose-resvératrol trans) a été extraite de racines séchées de *Polygonum cuspidatum* et purifiée selon la méthode de Waterhouse et Lamuela-Raventós (1994). Les déhydrodimères de resvératrol (viniférines) ont été isolés par le Dr. Roger Pezet. L' ϵ -viniférine est extraite à partir de sarments de vigne broyés tandis que la δ -viniférine est synthétisée par réaction enzymatique à partir de resvératrol (Sigma, Suisse) par la stilbène oxydase issue de *Botrytis cinerea*. Le ptérostilbène (diméthoxy-3,5 hydroxy-4' stilbène trans) a été synthétisé selon Pezet et Pont (1988).

4.2 Etude de l'effet biocide du resvératrol et ses dérivés sur la germination des conidies d'*E. necator*

Des solutions acétoniques de stilbènes ont été ajoutées à une solution aqueuse d'agar technique n° 3 (1.2%, m/v, Oxoid), les concentrations en stilbènes variant de 1 à 1000 µM. Le témoin consiste en une solution aqueuse d'acétone à 1% (v/v). Les solutions sont étalées sur des lames de verre, et, après séchage, inoculées par balayage au pinceau de feuilles infectées. Les lames sont disposées dans des conditions de croissance du pathogène (§1) et la germination des conidies est évaluée à 24 et 48 hpi par observation au microscope photonique. Trois lames ont été inoculées par concentration et par stilbène et une moyenne de 100 conidies ont été comptées par lame, l'expérimentation ayant été renouvelées deux fois. La concentration effective causant 50% d'inhibition de la germination des conidies a été calculée à partir d'une sigmoïde "dose-réponse" à pente variable [$y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \text{Hillslope}})$] du module de régression Sigmaplot.

4.3 Analyse du contenu en stilbènes de disques foliaires infectés

Pour chaque cultivar testé, 3 disques foliaires infectés (Ø 1 cm) sont récoltés chaque jour sur la période de suivi de l'infection (1 à 5 jpi). Chaque disque est pesé et placé individuellement dans un tube Eppendorf (1.5 ml) contenant 70 µl de méthanol, puis placé dans un bloc thermorégulateur (VORTEMP 56 EVC) à 60°C durant 10 min sous agitation modérée (80 rpm). 30 µl de l'extrait méthanolique sont analysés qualitativement et quantitativement par HPLC (Solvent Rack SOR-100, P680 Pump, ASI 100 Automated Sample Injector, PDA-100 Photodiode Array Detector, logiciel Chromoleon, Dionex) selon la méthode décrite par Pezet *et al.* (2003). Le système est équipé d'une colonne LiChroCart 250 mm x 4 mm, 5 µm, RP-18 (HPLC Cartridge). La phase mobile est constituée d'un système isocratique d'acétonitrile dans de l'eau nanofiltrée: 1 min CH₃CN/H₂O 20:80, gradient linéaire durant 30 min jusqu'à CH₃CN/H₂O 75:25, gradient linéaire durant 2 min jusqu'à CH₃CN/H₂O 100:0, 3 min à 100% CH₃CN, gradient linéaire durant 1 min jusqu'à CH₃CN/H₂O 20:80, 4 min à CH₃CN/H₂O 20:80, délivré à un flux de 1 ml min⁻¹. Les résultats sont exprimés en pg par mg de poids frais (pg mg⁻¹ PF) et en pg par appressorium (pg appr.⁻¹). La comptabilisation du nombre d'appressoria est déterminée par observation microscopique avant extraction méthanolique. Des disques non infectés sont employés comme contrôle.

Afin de confirmer le confinement de la synthèse de stilbènes au site d'infection et ainsi valider l'expression de la quantité de stilbènes par appressorium, 6 disques foliaires (Ø 0,4 cm) sont découpés dans des zones saines de feuilles de Chasselas, situées à la

périphérie d'une zone sporulante. Six autres disques sont prélevés dans la zone infectée. L'absence du pathogène dans les zones saines a été vérifiée par microscopie photonique.

5 Analyses qualitatives et quantitatives des cires cuticulaires

5.1 Echantillonnage des cires cuticulaires de la surface adaxiale des feuilles

5.1.1 Extraction mécanique sélective des cires épicuticulaires

Un film polymère de gomme arabique est employé pour retirer de manière sélective et mécanique les cristaux de cires épicuticulaires tapissant la surface adaxiale de feuilles.

Pour cela, 2 g de gomme arabique (Merck) sont suspendus dans 60 mL d'une solution de méthanol:chloroforme (2:1, v/v) et soumis à sonication à une fréquence de 25 et 50 KHz durant 10 min chacune. La solution est filtrée sur papier filtre ($\varnothing$ 18.5 cm, Schleicher et Schuell) et la gomme est lavée deux fois au chloroforme, puis séchée sous un flux léger de N_2 afin d'éliminer toute trace de chloroforme. Cette opération de lavage permet l'extraction exhaustive de toutes impuretés. Une solution aqueuse de gomme arabique (90%, m/m) est appliquée sur une aire délimitée de surface foliaire à l'aide d'un pinceau. Une fois le polymère de gomme sec et stable (environ une heure de séchage à air ambiant), le film dans lequel sont scellés les cristaux de cires épicuticulaires est décollé et placé dans un tube en verre.

L'expérience est effectuée sur 4 feuilles de même niveau d'insertion (4 et 5) provenant de 2 individus différents, à raison de 2 zones par feuilles. Chaque zone circulaire ($\varnothing$ 2.5 cm) présente une surface de 4.91 cm². Les films provenant d'une même expérimentation sont réunis et 10 μ l de nonadécanoate de méthyle (Fluka) à une concentration de 1 μ g μ l⁻¹ sont ajoutés immédiatement comme standard interne de quantification.

Après traitement à la gomme arabique, la surface foliaire est physiquement intacte et peut-être traitée de la même façon, afin de recueillir les cires épicuticulaires restantes. Trois répétitions maximum de l'opération sont autorisées puisque une dessiccation légère due à la présence du film engendre des microdéchirures qui empêchent toute extraction ultérieure. Une extraction finale au chloroforme permet de récupérer sélectivement les cires intracuticulaires.

L'expérimentation a été répétée trois fois.

5.1.2 Extraction des cires cuticulaires totales

L'extraction des cires cuticulaires de la surface adaxiale est réalisée en positionnant et appuyant légèrement un cylindre en verre ($\varnothing$ 2.5 cm) que l'on remplit d'environ 1.5 ml de chloroforme (Merck, pureté > 99.8%). Le solvant est agité par des "va et vient" successifs avec une pipette pasteur durant 30 sec. Cette opération est répétée une fois sur la même aire précédemment extraite et les deux extraits sont additionnés. Les extraits de 10 feuilles individuelles de niveau d'insertion 4 et 5 à partir de l'apex, à raison de deux zones par feuille sont réunis, et 30 μ l (1 μ g μ l⁻¹) de nonadécanoate de méthyle sont ajoutés immédiatement comme standard interne. L'expérimentation a été répétée trois fois.

5.2 Traitement des échantillons et analyse chimique

Les films de gomme arabique sont agités dans 10 ml d'eau nanopure (Millipore) jusqu'à dissolution complète du polymère, auxquels sont ajoutés 10 ml de chloroforme. La phase organique est récupérée après agitation et séparation de phase par centrifugation (5000 rpm, 5 min), puis concentrée par évaporation sous vide (Rotavapor Büchi).

La dérivation des groupements fonctionnels polaires (principalement les atomes d'hydrogènes actifs) a été choisie en fonction des composés chimiques attendus, constitutifs des cires cuticulaires. La silylation repose sur la substitution des atomes d'hydrogène actifs par un groupement "triméthylsilyle", qui accroît la volatilité et confère une meilleure stabilité thermique à l'échantillon. Les composés contenant des groupements hydroxyles ont été transformés en leur dérivés "triméthylsilyle", par ajout de 20 μ l de [N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide] (Macherey-Nagel) avec 1% de triméthylchlorosilane, qui améliore la silylation des groupements hydroxyles encombrés stériquement et des composés difficiles à dériver comme les alcools, dans 80 μ l de pyridine (Fluka) à 70°C durant 30 min. Après refroidissement, la réaction est stoppée par l'adjonction de 500 μ l de chloroforme et 1 ml d'une solution aqueuse de 1 % d'acide chlorhydrique (6M, v/v). Après séparation de phase (centrifugation 5000 rpm, 2 min), la phase organique est récupérée et concentrée sous un léger flux de N₂ avant injection.

L'analyse qualitative et quantitative des composés chimiques constitutifs des cires cuticulaires est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (Autosystem XL; PerkinElmer) en injection indirecte (technique "split") sur colonne (XLB elite, longueur: 30 m, diamètre intérieur: 0.25 mm, épaisseur de film: 0.5 μ m; PerkinElmer) couplée à une détection par spectrophotométrie de masse (70 eV, m/z 25-600; TurboMass Gold; PerkinElmer). Les paramètres de températures du four (GC) sont chronologiquement 1 min à 150°C, 30°C min⁻¹ jusqu'à 180°C puis 2.5°C min⁻¹ jusqu'à 320°C, 12 min à 320°C. Le gaz vecteur est de l'hélium avec un flux de 1.2 ml min⁻¹. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert sont respectivement de 180 et 280°C.

Les composés ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec les références de la base de données NIST (National Institut of Standards and Technology, USA) et les chromatogrammes de standards commerciaux, obtenus dans les mêmes conditions de chromatographie. Les composés présentant une incertitude d'identification ont été confirmés par le logiciel AMDIS.

5.3 Chromatographie en couche mince

L'extraction chimique des cires cuticulaires de la surface adaxiale a été réalisée comme mentionné au §5.1.2. Les extraits de chaque feuille ont été réunis puis concentrés par évaporation sous vide (Rotavapor Büchi). Les extraits secs de *V. vinifera* cv Chasselas et *Vitis candidans* ont été dissous dans 100 µl de chloroforme puis séparés par chromatographie unidimensionnelle sur couche mince (50 µl par dépôt, gel de silice 60 F₂₅₄, épaisseur de la couche 0.25 mm, Merck) dans un solvant de migration hexane : éther diéthylique : acide acétique (78:20:4, v/v/v) (Comménil *et al.*, 1996). Le chromatogramme a été révélé par pulvérisation de primuline à 0.1% dans une solution aqueuse d'acétone à 80%. La lecture a été réalisée sous lumière UV à 365 nm et chaque fraction détectée a été recueillie par grattage de la silice. La silice récupérée a été éluée dans un mélange chloroforme:méthanol (2:1, v/v) sous agitation. L'éluat est séché par flux N₂ à 40°C, repris dans 100 µl de chloroforme, dont 50 µl ont été répandus à la surface d'une lame gélosée (solution d'agar technique n° 3 à 1.2%, m/v, Oxoid) et séchés sous hôte à flux laminaire. Deux lames témoin contiennent respectivement le milieu gélosé seul et additionné de 50 µl de chloroforme. Après évaporation du solvant, les lames ont été inocuées par balayage au pinceau de feuilles infectées. La germination des conidies et la formation d'appressorium ont été évaluées au microscope photonique à 24 hpi. Les 50 µl restants sont préparés selon le §5.2 afin d'identifier par GC-MS la composition chimique des différentes fractions distinguées par CCM.

6 Analyse du complexe de cutine

6.1 Extraction et purification de cutine et analyse de leur composition chimique

L'extraction de cutine a été réalisée à partir de 100 g de feuilles. Les cires épicuticulaires et les acides gras libres ont été éliminés par plusieurs lavages au chloroforme et une extraction de 18 h au Soxhlet contre du chloroforme. Les épidermes ont été digérés dans un tampon MacIlvaine (acide citrique 0.1 M, phosphate de sodium dibasique anhydre 0.2 M) deux fois 24 h à 30°C, en présence de 1% (m/v) de pectinase (Fluka) et 1% (m/v) de

cellulase (Fluka). Les fragments obtenus de cutine ont été lavés dans de l'eau puis du chloroforme avant d'être séchés à 60°C au four durant 2 h et réduits en poudre.

L'hydrolyse chimique s'est déroulée selon une méthode modifiée de Salinas *et al.* (1986). La cutine de chaque cépage (10 mg) a été mise en présence de 9 ml d'une solution de NaOH méthanolique (0,5 M) à 100°C durant 18h. Après arrêt de l'hydrolyse par acidification (100 µl HCl à 12 M), trois extractions à l'acétate d'éthyle ont été effectuées puis la fraction organique récupérée est filtrée au travers de laine de verre en présence de sulfate d'ammonium. L'hydrolysate est séché sous flux de N₂ et stocké sec jusqu'à utilisation. La méthanolisation est réalisée dans 300 µL d'acide chlorhydrique/méthanol (1M) à 80°C durant 24h (Marga *et al.*, 2001). La dérivation « trimethylsilyle » est préparée par l'addition de 20 µL de N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide avec 1% de trimethylchlorosilane et 80 µL pyridine, à température ambiante pendant une heure. La séparation et l'identification des composés de cutine par GC-MS ont été réalisées selon les mêmes conditions que celles décrites au §5.2.

6.2 Détermination et localisation d'une activité cutinase dans les conidies d'*E. necator*

6.2.1 Détermination d'une activité estérase

Environ 30 mg de conidies ont été prélevées sur des plantes infectées, mises en solution dans 20 ml d'eau distillée avec 2% Triton X-100 à 4°C durant 24 h, puis centrifugées (10'000 rpm) à 4°C durant 10 min. Le surnageant, correspondant à la fraction protéique pariétale, est placé dans un tube à dialyse puis concentré sur un lit de polyéthylène glycol (PEG 20'000, Fluka) jusqu'à réduction du volume à 1 ml. Le culot, correspondant à la fraction protéique cytoplasmique, est placé dans un tube en verre en présence de 1 g de billes de verre de deux dimensions (Ø 0.25 à 0.3 mm et 0.17 à 0.18 mm) préalablement hydratées. Le mélange est vortexé 3 fois durant 10 min. La fraction est concentrée dans un tube à dialyse sur PEG après élimination des billes par décantation.

L'activité estérase est mesurée spectrophotométriquement, basée sur l'hydrolyse du para-nitrophénylbutyrate (PNB) en para-nitrophénol selon la méthode modifiée de Huggins et Lapidès (1947). L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel (2.8 ml de tampon Tris-HCl 0.1 M, pH 7.3 contenant 0.3% (v/v) Triton X-100 et 0.01% (v/v) PNB, 200µl d'extrait protéique) a été mesurée à 405 nm à 25°C durant 3 minutes. La concentration protéique totale de chaque fraction est déterminée par la moyenne de trois mesures spectrophotométriques à 280 nm.

6.2.2 Localisation histochimique de l'activité estérase

La localisation de l'activité estérase au sein des conidies d'*E. necator* a été visualisée en utilisant de l'indoxyl acétate comme substrat, selon une méthode modifiée de Deising *et al.* (1992) (agar technique Oxoid 1.2%, NaCl 1 M, CaCl₂ 45 mM, indoxyl acétate 3.5 mM, dans un tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8.0). Le milieu décrit a été coulé sur lame de verre, inoculé par des conidies d'*E. necator* et incubé en chambre climatisée durant 24 h. L'hydrolyse du substrat provoque l'accumulation de cristaux d'indigo au niveau du site d'hydrolyse, visibles en microscopie photonique. Des conidies ont été dénaturées par autoclavage afin de servir de contrôle négatif. Au total, 100 conidies de chaque traitement ont été observées.

6.2.3 Détermination d'une activité cutinase

L'activité cutinase a été mesurée au moyen de cutine de tomate (*Lycopersicon esculentum*) marquée radioactivement selon la méthode de Pascholatti *et al.* (1992). Le substrat est composé de 5 mg de (³H)-cutine et 15 mg de cutine froide préparée selon la méthode décrite par Salinas *et al.* (1986). La poudre de cutine est lavée plusieurs fois par centrifugation avec 30 mL de tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7.3) puis filtrée sous vide. La cutine récupérée est suspendue dans une solution de 500 µL de tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7.3), 50 µL d'une solution aqueuse de thimerosal (2%) et 100 µL d'une fraction protéique extraite de conidies non germées d'*E. necator* comme décrit précédemment. Le mélange réactionnel a été incubé à 30°C durant 24 h puis la réaction a été stoppée par acidification (100 µL HCl à 6M). Le matériel non solubilisé a été séparé par filtration sous vide et lavé trois fois par filtration sous vide avec du tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7.3). Le filtrat a été partitionné trois fois à l'acétate d'éthyle afin d'extraire les acides gras libérés après hydrolyse enzymatique de la cutine. La phase organique a été séchée par 2 g de chlorure de calcium, filtrée à travers de la laine de verre et évaporée sous vide à 40°C. Le résidu sec a été solubilisé dans 4.5 ml de liquide de scintillation (Opti-Fluor) puis la radioactivité a été mesurée sur un spectromètre à scintillation liquide (Intertechnique SL-30).

6.2.4 Extraction des protéines pariétales de conidies non germées de *Botrytis cinerea*

Afin d'extraire en quantité suffisante une estérase à activité cutinolytique nécessaire à l'identification de monomères de cutine libérés après hydrolyse enzymatique, le choix s'est porté sur l'extraction de cette enzyme issue de *B. cinerea*, pathogène dont la biomasse est plus rapide et facile à récolter. L'activité cutinase étant localisée dans la fraction cytoplasmique des conidies non germées de *B. cinerea* (Gindro, 1997),

l'extraction des protéines cytoplasmiques des conidies de *B. cinerea* a été entreprise selon la méthode modifiée de Van Etten et Brambl (1969). *B. cinerea* a été cultivé sur milieu Potato Dextrose Agar (Difco) par étalement de 200 µl d'une suspension aqueuse de conidies (7×10^3 conidies ml^{-1}). Les cultures ont été placées en incubateur à 21°C, photopériode de 12 h, intensité lumineuse de 30 µmol photons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Les conidies obtenues par sporulation ont été récoltées stérilement par un système d'aspiration sous vide (Pezet et Pont, 1990). Environ 8 g de conidies ont été ainsi récoltées puis suspendues dans 15 ml d'eau distillée dans un tube en verre (Pyrex, † 200 mm, Ø 20 mm) muni d'un bouchon à vis avec joint en téflon. Deux grammes de deux catégories de taille de billes de verre (Ø 0.25-0.30 mm et Ø 0.17-0.18 mm, Braun Melsungen AG) ont été ajoutées à la suspension qui a été vortexée sur agitateur à tube (Vortex Genie 2) à vitesse maximale durant 3 périodes de 10 min, alternant avec des incubations de 10 min sur glace. La suspension a été centrifugée (12'000 rpm, 4 °C, 20 min, rotor Sorvall SL-50T, Sorvall Super T21) puis le surnageant a été placé dans un tube à dialyse (Spectra/Por® 6-8'000 MWCO, Spectrum) et concentré sur un lit de polyéthylèneglycol 20'000 (Fluka) à 4 °C jusqu'à réduction à $1/10^{\text{e}}$ du volume initial. L'extrait concentré est à nouveau centrifugé (12'000 rpm, 4 °C, 20 min) et le surnageant filtré (Akrodisk Nalgene, 0.22 µm). Le filtrat a été stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

6.3 Analyse des monomères de cutine libérés après hydrolyse enzymatique:

La cutine de vigne (1 mg) est lavée plusieurs fois au moyen de tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7.3). Chaque culot de cutine est suspendu dans 500 µl de tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7.3) contenant 0.02 M de détergent non ionique n-dodecylglucoside (Sigma), 50 µl de thimerosal à 2% et 500 µl d'extrait enzymatique, dont l'activité cutinase a été mise en évidence précédemment. Le mélange réactionnel est incubé à 30°C sous agitation (80 rpm) durant 24 h. La réaction est stoppée par acidification par ajout de 100 µl d'acide chlorhydrique (12 M). Le matériel non solubilisé est éliminé par filtration sous vide (Nalgene® Disposable Filterware 30 ml) et lavé avec du tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7.3). Le filtrat est partitionné trois fois à l'éther de pétrole, afin d'extraire les acides gras libérés par dégradation enzymatique de la cutine. La phase organique est séchée sous flux N_2 à 40°C. Les opérations de dérivatisation et d'analyse par GCMS sont identiques au §5.2.

7 Détection de QTL de résistance à l'oïdium

7.1 Matériel végétal et extraction d'ADN

La population d'étude 42048 résulte d'un croisement entre un rétrocroisement de 5^{ème} génération de *Muscadinia rotundifolia* rétrocroisé avec *Vitis vinifera* (parent femelle) et du cultivar Bronner (*Vitis vinifera* pour l'essentiel du fond génétique, parent mâle). Les individus de cette population ont été cultivés à l'INRA de Colmar et ont été génotypés avec deux marqueurs encadrant *Rpv1*, QTL lié à la résistance au mildiou, via un kit Redextraction-N-AMP Plant PCR (Sigma).

Les individus portant les allèles liés à la résistance donnée par *Rpv1* n'ont pas été évalués dans cette étude. Seuls 188 individus ayant les allèles liés à la sensibilité à *Plasmopara viticola* au locus *Rpv1* ont été phénotypés sur les caractères de résistance à *E. necator*.

7.2 Extraction de l'ADN des individus de la population

L'ADN a été extrait à partir de 100 mg de feuilles complètement développées, de premier rang d'insertion sur le rameau depuis l'apex. Les fragments foliaires sont réduits en poudre dans un tube eppendorf au moyen d'une bille de tungstène, après congélation à l'azote liquide et agitation dans un Tissus Lyser (Qiagen) durant 1 min. La lyse est assurée selon le protocole du "Qiagen Biosprint96 DNA plant Kit", à savoir 500 µl du tampon de lyse en présence de protéinase K sont ajoutés au broyat. Les échantillons sont broyés une seconde fois avec le Tissus Lyser, et sont incubés durant deux périodes de 30 min à 50°C, puis à 85°C. Après centrifugation à 7'500 rpm, 200 µl de surnageant sont prélevés auxquels sont ajoutés 200 µl d'isopropanol et 20 µl de la solution MagAttract Suspension G. Le lavage et l'élution de l'ADN se fait en plaque de 96 puits par le robot Biosprint96 (Qiagen). L'ADN est élué dans 100 µl d'eau (ultrapure Dnase free, Qiagen) et sa concentration est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. La pureté de l'ADN est également vérifiée par le calcul du ration "260 nm / 280 nm" devant être compris entre 1.8 et 2.

7.3 Génotypage

Le génotypage des individus de la population a été réalisé par l'utilisation de marqueurs microsatellites spécifiques au genre *Vitis*, développés au sein d'un consortium international (VMC: Vitis microsatellite consortium) ou à l'INRA (VVI: *Vitis vinifera* INRA). Des marqueurs microsatellites hétérozygotes chez le parent Bronner, détectés au sein du laboratoire de Colmar, ont été inclus dans l'analyse.

Les PCR ont été réalisés dans un volume réactionnel de 8 µl, en utilisant des multiplex de trois marqueurs. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse capillaire

avec détection automatique (ABI 310 DNA, Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA). Les profils d'électrophorèses ont été analysés par le logiciel Genotyper DNA fragment analysis version 2.5.2 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA), afin de déterminer la taille des allèles pour chaque marqueur. De cette manière, 62 loci ont ainsi été évalués comme marqueurs ségrégants dans la population d'étude. La distribution des fréquences alléliques des génotypes étudiés est comparée à la distribution théorique mendélienne par test d'ajustement du χ^2 . Les loci présentant une distorsion de ségrégation ont été exclus de l'analyse.

7.4 Evaluation phénotypique

L'appréciation du caractère de résistance à *E. necator* est basée sur cinq critères phénotypiques: le pourcentage de disques sporulants, la surface moyenne de sporulation, note visuelle de l'intensité de sporulation (0: absence; 1: faible; 2: régulière; 3: abondante) (Figure 8) et l'index de sensibilité (critère hybride regroupant les 3 critères précédents; 0: résistant à 100: sensible). Le critère "apparition de nécroses spontanées" (0: absence; 1: présence) ne constitue pas un critère d'évaluation direct de la résistance à l'oïdium mais semble être corrélé à l'observation de l'inhibition du développement du pathogène. L'évaluation phénotypique s'est portée sur l'observation de 10 disques foliaires ($\varnothing$ 1 cm) de chaque génotype, prélevés sur les feuilles de niveau d'insertion 4 et 5 depuis l'apex, et placés dans les mêmes conditions d'inoculation que celles décrites précédemment. Des boîtes de Pétri de 25 x 25 cm permettent d'évaluer 35 génotypes ainsi que cinq génotypes de contrôle, évaluant l'homogénéité des infections (Chasselas: témoin sensible, Bronner: témoin résistant; les individus 1005, 1059 et 1237 de la population, choisis au hasard). La lecture des résultats a été réalisée 10 jours après l'infection. L'expérimentation a été répétée deux fois.

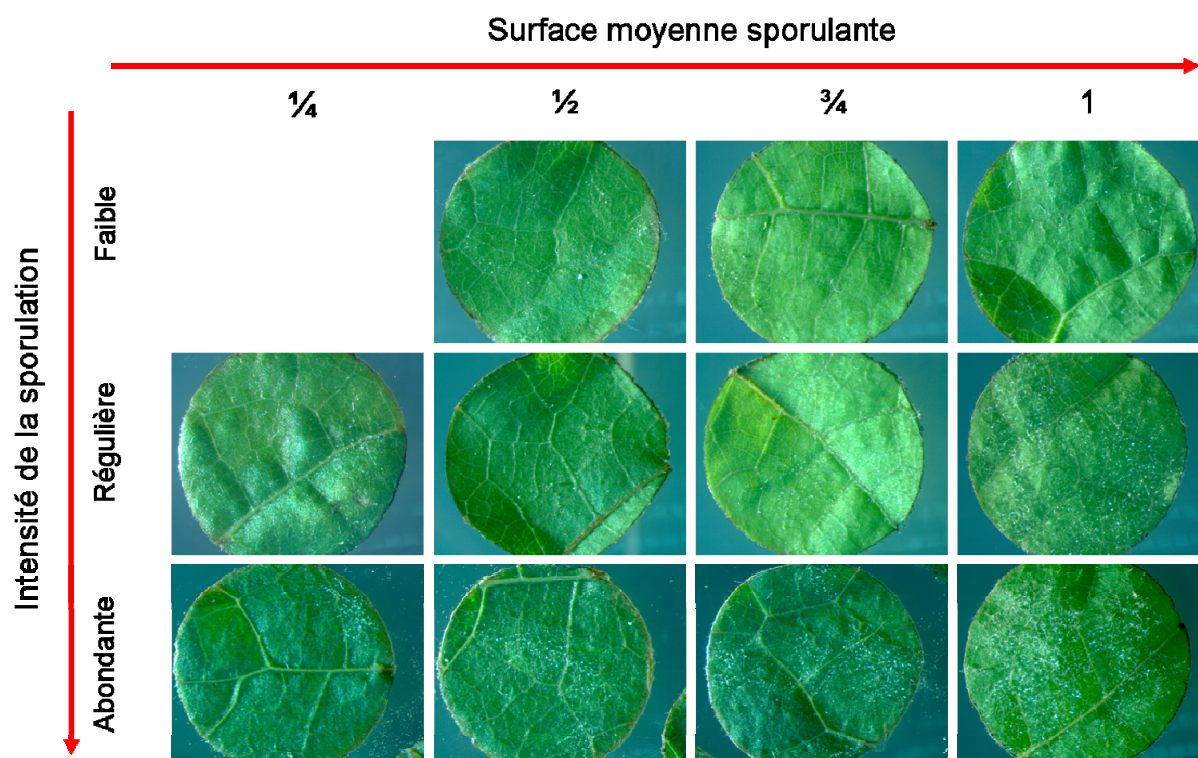


Figure 8 Références pour la notation des critères phénotypiques de sensibilité à l'oïdium selon la surface moyenne de sporulation et l'intensité de sporulation.

7.5 Analyse et détection de QTL

Les données phénotypiques sont introduites séparément dans le logiciel MapQTL pour analyser la présence de QTL. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (test de rang) hiérarchise simultanément tous les génotypes en fonction de la valeur du caractère phénotypique et la combinaison allélique au locus marqueur, analysé individuellement. Un QTL en ségrégation étroitement lié avec un locus marqueur indique une différence significative entre la moyenne de rang des combinaisons génotypiques. Le test de Kruskal-Wallis faisant abstraction des liaisons entre loci, un seuil significatif de $P < 0.005$ a été retenu pour les tests individuels, définissant un niveau significatif général avoisinant 5%.

Pour les marqueurs présentant un effet, une analyse de variance est réalisée entre les combinaisons alléliques et le critère phénotypique, afin d'estimer l'effet spécifique de chaque allèle parental. L'analyse de variance de type III a été prise en compte, afin de tenir compte du déséquilibre d'effectifs des modalités. Le coefficient de détermination R^2 est précisé et représente la proportion de variation phénotypique expliqué par chacun des loci-marqueurs.

8 Traitement statistique

Toutes les données obtenues ont été soumises à analyse de variance et comparaison multiple de différence (tests de Tukey, $P \leq 0.05$). Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé quand les conditions d'applications de l'ANOVA n'étaient pas réunies. Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel XLstat.

Chapitre I : Suivi du développement d'*Erysiphe necator* sur des hôtes de sensibilité différente

1 Introduction

L'étude de la résistance à l'oïdium a été traitée par de nombreux auteurs afin d'évaluer les sources de résistance provenant de différentes espèces et cultivars de *Vitis vinifera* (Boubals, 1961; Doster et Schnathorst, 1985b; Li, 1993; Eibach, 1994; Wang *et al.*, 1995, Staudt, 1997). La détermination du niveau de sensibilité à *Erysiphe necator* permet de comparer les cépages cultivés afin d'améliorer la sélection variétale, mais également de poser les bases de recherche de l'expression du phénomène de résistance. L'élaboration de test de sélection précoce de résistance à l'oïdium, notamment par l'infection de disques foliaires (Stein *et al.*, 1985), permet l'évaluation du niveau de résistance au pathogène.

Ce chapitre présente une description séquentielle du développement des structures fongiques d'*Erysiphe necator* sur *V. vinifera* cv Chasselas, connu pour sa sensibilité au pathogène. Le comportement d'*E. necator* sur d'autres espèces et sur des hybrides interspécifiques, issus du programme de sélection d'Agroscope Changins-Wädenswil, a été évalué en vue de positionner chronologiquement l'apparition de phénomène de résistance de l'hôte.

2 Résultats

2.1 Développement des structures infectieuses d'*E. necator* sur un hôte référencé sensible

Le processus infectieux d'*E. necator* a été suivi sur des disques foliaires de *Vitis vinifera* cv Chasselas, afin d'établir la chronologie des séquences de développement du pathogène en conditions optimales de croissance. Les conidies matures d'*E. necator* sont de forme ovoïde à cylindrique et se caractérisent par une surface rugueuse (Figure 9A). Dans les 2 heures suivant le dépôt de la conidie à la surface de l'hôte, le processus de germination aboutit à l'émergence d'un tube germinatif à l'une des extrémités de la conidie (Figure 9A). Après une élongation variable, l'apex du tube germinatif se différencie en appressorium, bi- à quadrilobé (Figure 9B). L'apparition d'un hyphe primaire (Figure 9C) indique l'installation d'un haustorium fonctionnel dans la cellule épidermique infectée. Cet hyphe émerge généralement du côté opposé à celui du tube

germinatif; cet événement est suivi par l'apparition d'un hyphe secondaire à partir de l'appressorium primaire (Figure 9D,E). Toutefois, le lieu de génèse des hyphes primaires et secondaires peut s'invertir. A 20 hpi, 60% des conidies germées ont atteint le stade "appressorium primaire" et 30% présentent un hyphe primaire. La formation d'appressoria est initiée le long des hyphes en croissance (Figure 9E); et parallèlement, un hyphe tertiaire peut émerger de la conidie à proximité du tube germinatif. Ce stade est atteint par 35% des conidies germées dans les premières 48 hpi. Sur les hyphes, les appressoria apparaissent en général régulièrement sur chaque deuxième cellule. A partir de 2 jpi, des embranchements d'hyphes (Figure 9F,G) s'observent et le réseau mycélien à proprement parlé, se développe, matérialisé par la production régulière d'appressoria. Les premiers conidiophores multi-septés apparaissent 5 jpi et la conidiogénèse a lieu 6 jpi (Figure 9H).

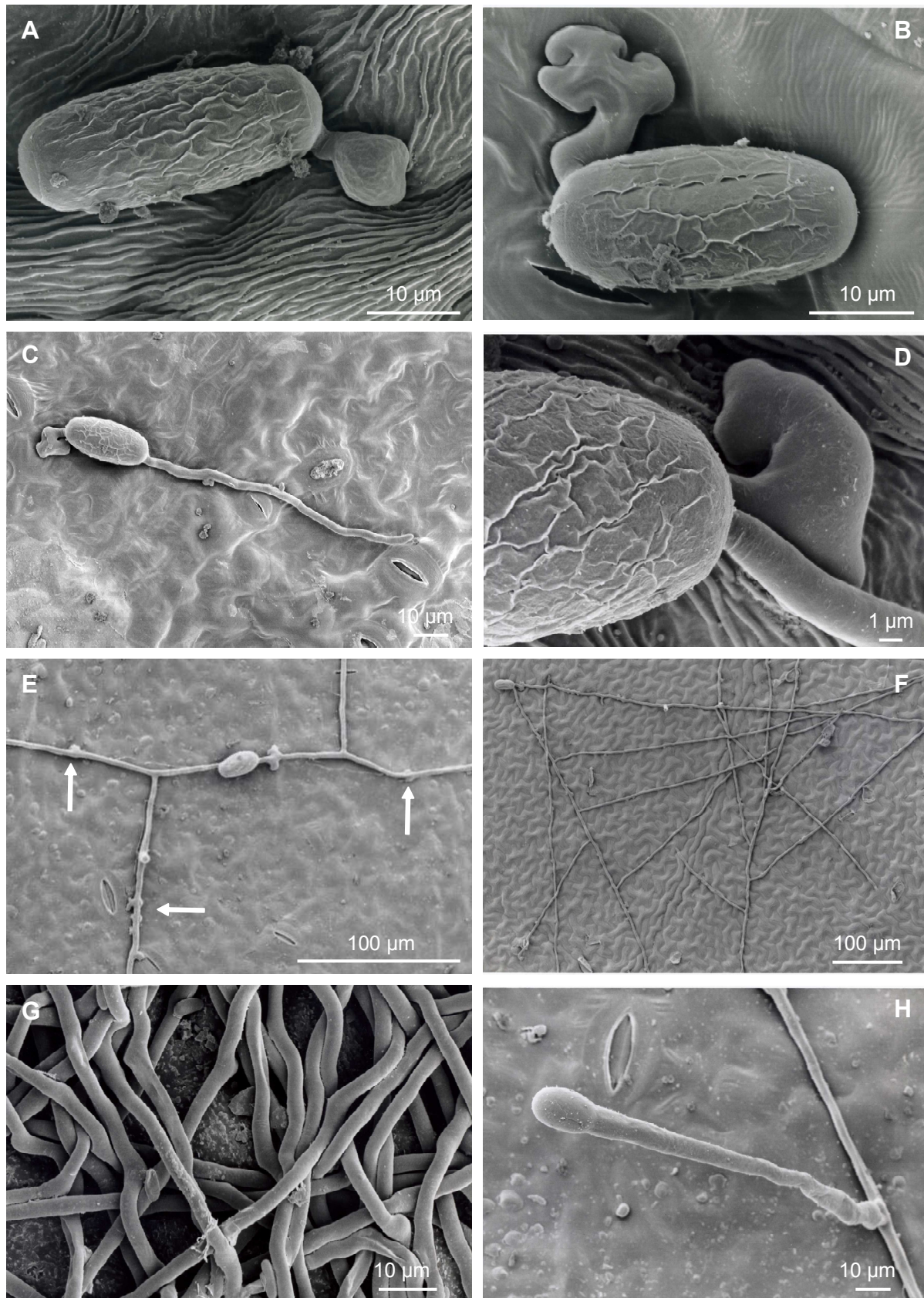


Figure 9 Cycle de développement asexué d'*E. necator* sur *V. vinifera* cv Chasselas, observé au microscope électronique à balayage. A. Germination de la conidie et début de différenciation de l'appressorium par gonflement de l'apex du tube germinatif (1 à 4 hpi); B. Différenciation de l'appressorium trilobé (1 à 8 hpi); C. Développement du premier hyphe du côté opposé du premier appressorium. D: Initiation de l'hyphe secondaire (1

jpi); E. Formation d'appressoria hyphaux (flèches) et embranchement des hyphes (2-3 jpi); F. Développement du réseau mycélien (3-4 jpi); G. Mycélium capable de recouvrir tout la surface foliaire à des stades avancés d'infection; H. Emergence d'un conidiophore dressé et différenciation d'une conidie isolée à l'apex (6 jpi).

2.2 Formation de l'haustorium

L'appressorium à la surface de l'hôte élabore un hyphe de pénétration qui perfore successivement la cuticule et la paroi cellulaire végétale. Un renflement se forme à l'extrémité de l'hyphe de pénétration, où se forme l'haustorium (Figure 10). Une cloison délimite l'hyphe de pénétration de l'haustorium. Cet hyphe est entouré par une matrice granuleuse, qui s'estompe en direction du corps de l'haustorium. Cette enveloppe s'invagine au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte sans introgression du cytoplasme de la cellule-hôte.

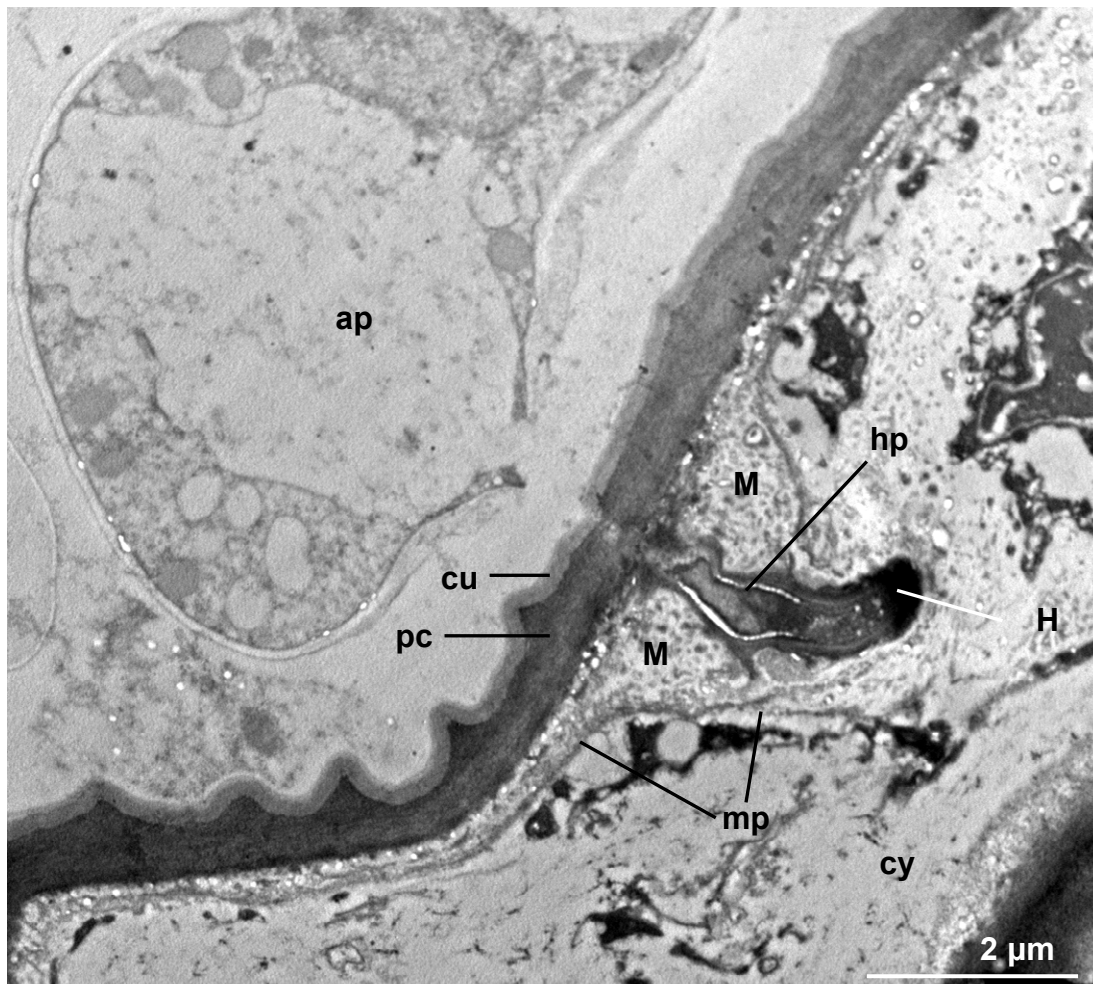


Figure 10 Coupe transversale en microscopie électronique à transmission d'une cellule épidermique de *V. vinifera* cv Chasselas infectée par *E. necator*. ap: appressorium, cu: cuticule, cy: cytoplasme, hp: hyphe de pénétration, H: haustorium, M: matrice extra-haustoriale, mp: membrane plasmique, pc: paroi cellulaire.

2.3 Comparaison de développement d'*E. necator* sur différents hôtes

A partir de 4 heures après l'inoculation, deux tiers des conidies déposées sur la surface adaxiale des disques foliaires de cultivars sensibles (*V. vinifera* cv Chasselas et IRAC 1999), ont germé. La moitié d'entre-elles ont déjà élaboré un appressorium. Les différences de développement d'*E. necator* sur les cultivars de sensibilité variable apparaissent entre 24 et 48 hpi. Le taux de germination des conidies est significativement inférieur chez *V. candidans* (Figure 11A) par rapport aux autres variétés étudiées. Le nombre d'hyphes émergeant du premier appressorium est très faible sur cette espèce, et le développement ultérieur est inhibé 2 jpi (Figure 11B). La structure fongique apparaît déposée à l'extrémité des cristaux de cires épicuticulaires (Figure 12).

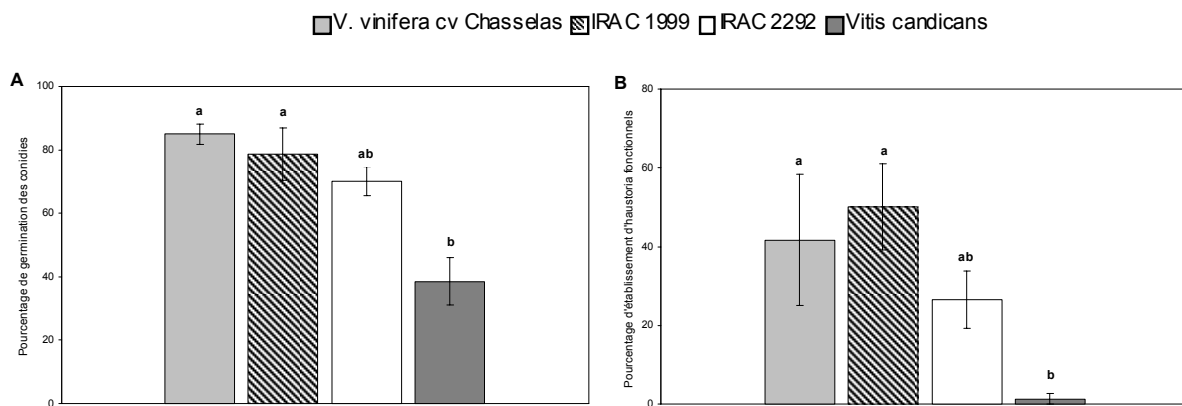


Figure 11 Comportement d'*E. necator* sur des disques foliaires à 2 jpi. A. Pourcentage de germination des conidies. B. Taux d'établissement d'haustoria fonctionnels dans les cellules infectées (déterminé par le pourcentage d'appressoria primaires générant un hyphe primaire). Les valeurs représentent la moyenne et l'erreur standard de 3 répétitions. Les histogrammes ayant une même lettre ne sont pas significativement différents ($P < 0.05$).

L'appressorium apparaissant sur IRAC 2292 et sur *V. candidans* présente de fréquents enchevêtrements de lobes (Figure 13 et 14), phénomène non observé sur les cépages sensibles. Les tubes germinatifs observés sur les espèces résistantes s'allongent considérablement avant la formation de l'appressorium (Figure 14). Les conidies sur *V. vinifera* cv Chasselas et sur les IRAC produisent des hyphes secondaires. Cependant, le taux de pénétration sur IRAC 2292 est inférieur à celui des cultivars sensibles (Figure 11B), et le développement du pathogène n'atteint pas le stade de réseau mycélien (Figure 15). Le développement ultérieur du pathogène est observé uniquement sur *V. vinifera* cv Chasselas et Pinot Noir, et IRAC 1999. Sur ce dernier, le cycle asexué complet est accompli en 7 jours. La densité du réseau mycélien et l'intensité de la sporulation sont inférieures par rapport à celles observées sur *V. vinifera* cv Chasselas.

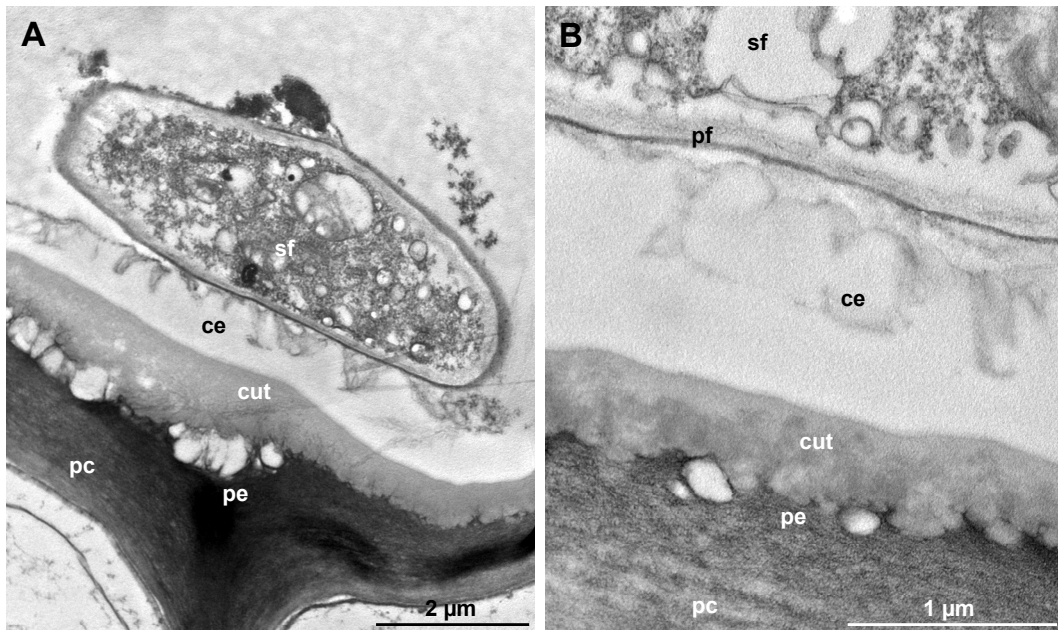


Figure 12 A. Structure fongique d'*E. necator* à la surface de *V. candidans*, observée au microscope électronique à transmission. B. Détail de A. ce: cires épicuticulaires; cut: cutine; pc: paroi cellulaire; pe: pectine; pf: paroi fongique; sf: structure fongique.

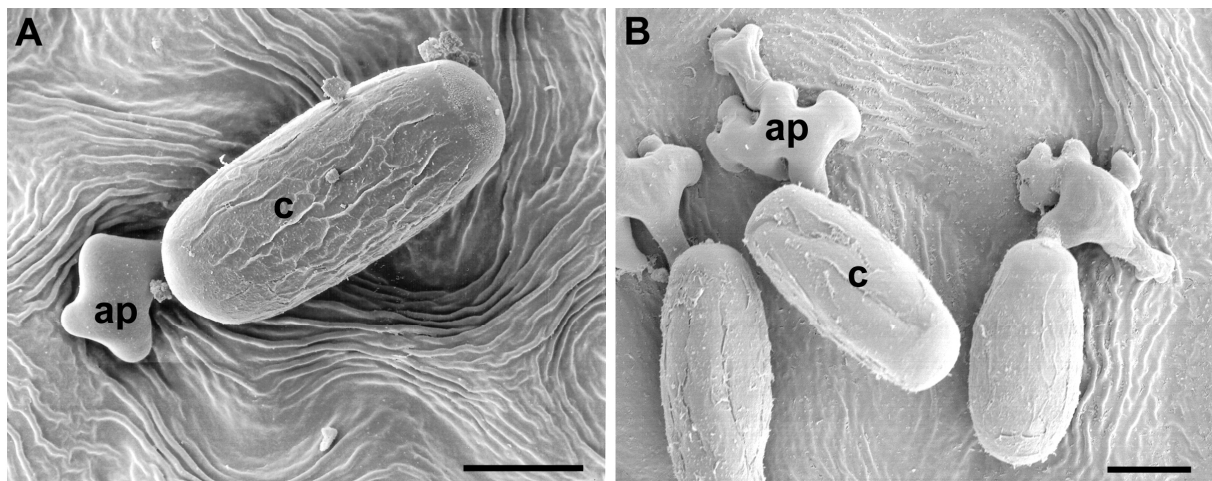


Figure 13 Morphologie de l'appressorium primaire d'*E. necator* observé au microscope électronique à balayage à 24 hpi. A. appressorium normal sur *V. vinifera* cv. Chasselas. B. appressorium anormalement multilobé sur le cultivar résistant IRAC 2292. c: conidie; ap: appressorium primaire. Les barres représentent 10 µm.

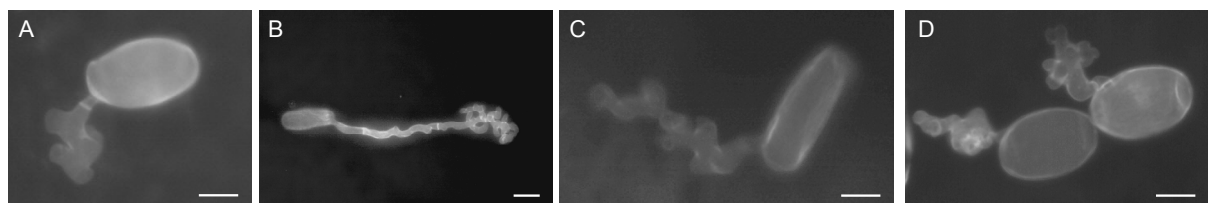


Figure 14 Observations en épifluorescence des tubes germinatifs et appressoria à 24 hpi sur *V. vinifera* cv Chasselas (A), IRAC 2292 (B), *V. candidans* (C) et *Muscadinia rotundifolia* (D). Les barres représentent 10 µm.

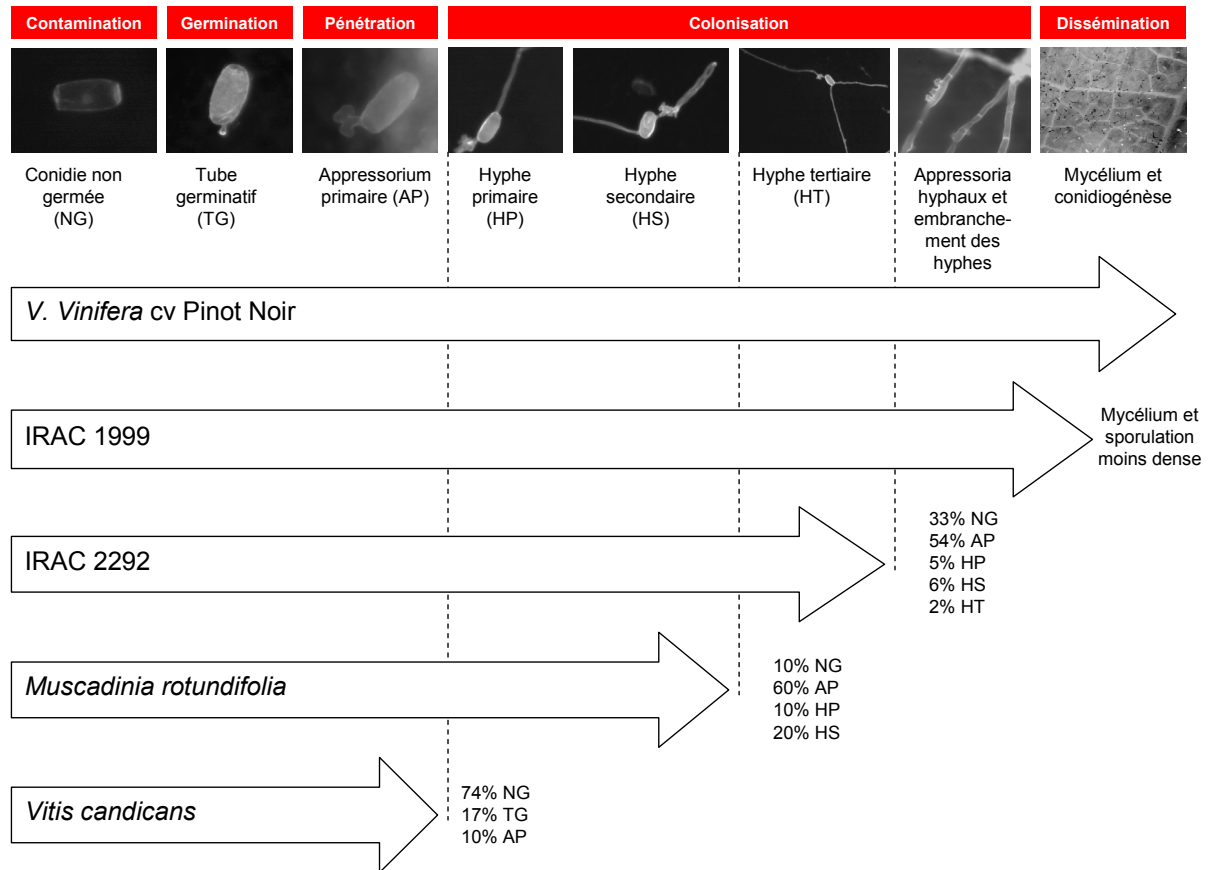


Figure 15 Réalisation du cycle infectieux d'*E. necator* sur différentes espèces de *Vitis*. Les flèches indiquent le stade ultime atteint par le pathogène et les observations individuelles d'arrêt de développement de l'infection sont précisées (pourcentage de conidies ayant atteint chaque stade).

2.4 Observation des structures de reproduction sexuée

Des infections de longue durée (entre 1 à 2 mois après inoculation) ont permis d'obtenir la forme téléomorphe d'*E. necator* sur feuilles de *V. vinifera* cv Chasselas. La rencontre de deux hyphes compatibles sexuellement aboutit à l'initiation d'un cleistothèce (Figure 16A). Les fulcres se développent durant la maturation du cleistothèce (Figure 16B). La croissance du mycélium augmente la probabilité de rencontre des deux types sexuels, et explique l'observation de cleistothèces de différents stades de maturité sur une même surface foliaire (Figure 16C).

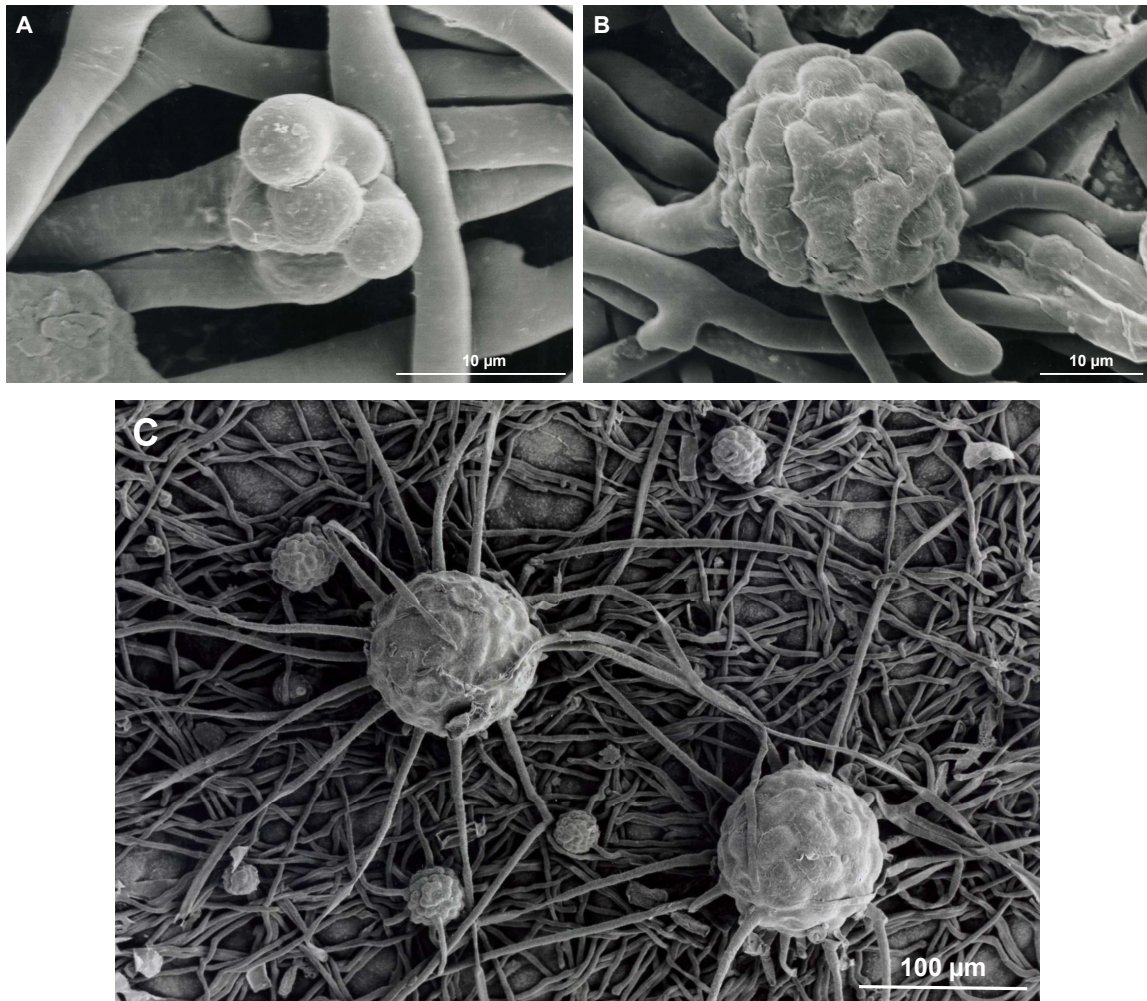


Figure 16 Structures de reproduction sexuée d'*E. necator*. A. Fusion de deux hyphes sexuellement compatibles. B. Jeune cleistothèce en maturation. C. Cleistothèces à différents stades de maturité, portant des fulcres pour les plus avancés.

3 Discussion

L'étude compare la sensibilité de différents cépages et espèces de *Vitis*, à partir de l'observation de l'infection de disques foliaires. Des feuilles de même niveau d'insertion issues de plantes présentant le même stade physiologique ont été sélectionnées pour l'infection, afin de se soustraire à la variabilité de la réceptivité, en fonction de l'âge des feuilles. Selon Heintz (1988), l'intensité de la sporulation diffère selon l'âge des feuilles (niveau d'insertion sur le rameau herbacé) et la différence de réceptivité dépend du cépage considéré. Le choix de l'infection s'est porté sur la surface adaxiale des feuilles, les symptômes au champ apparaissant essentiellement sur ce côté. Ceci peut s'expliquer par la facilité d'atteindre ce côté de la feuille pour des conidies anémochores, et d'une pilosité réduite à la face supérieure qui entrave moins l'accès à la surface de l'hôte.

Si la chronologie des stades infectieux d'*E. necator* a déjà été bien décrite sur des cultivars sensibles de *V. vinifera* (Leinhos *et al.*, 1997), peu d'études détaillent l'interruption précoce du développement du pathogène sur des cultivars présentant une résistance partielle ou totale. La détermination des stades de développement auxquels la croissance fongique est inhibée peut constituer une information importante afin de situer l'induction des mécanismes de résistance de la vigne. La chronologie des stades infectieux sur IRAC 1999 est similaire à celle du Chasselas, mais le développement d'un mycélium moins dense associé à une plus faible conidiogénèse est caractéristique d'une sensibilité plus faible à l'oïdium. La croissance d'*E. necator* sur IRAC 2292 est ralentie et peut être expliquée par une déformation partielle des appressoria. Le réseau mycélium épars et l'absence de sporulation définissent cet hybride comme résistant à l'oïdium. La présence d'espèces américaines (en particulier *V. rupestris* et *V. lincecumii*) dans le fond génétique des IRAC confère un certain niveau de résistance à la plupart des pathogènes de la vigne (Fung *et al.*, 2008). Sur *V. candicans*, le taux de germination des conidies est significativement plus faible que sur les autres cultivars testés dans ce travail. Les observations au MET montre que les cristaux de cires épicuticulaires élèvent la structure fongique au dessus de la surface foliaire, pouvant limiter la perception des signaux physico-chimiques nécessaires au développement du pathogène (Jenks et Ashworth, 1999). En outre, l'interruption du cycle au stade du premier appressorium suggère que le développement de l'haustorium dans les cellules épidermiques est inhibé et le processus infectieux est bloqué. La visualisation d'haustoria par MET chez cette espèce n'a cependant pas pu être encore obtenue.

La reconnaissance de l'hôte par le pathogène est très rapide puisque l'observation d'appressoria développés apparaît dès 4 hpi sur le cépage sensible. Les appressoria sont facilement identifiables sur les espèces sensibles testées. La fluorescence émise par les appressoria produits sur les espèces résistantes est parfois difficile à repérer. Cette diminution de fluorescence, liée à la coloration de la chitine par le diethanol, pourrait témoigner d'une baisse de viabilité du complexe appressorium-haustorium, due à la manifestation de réactions de défense. L'importante pilosité observée sur *V. candicans* ne perturbe pas l'accès des conidies à la surface foliaire, mais suggère un potentiel microclimat interférant sur les performances du champignon.

Dans le cas de *V. candicans* et *M. rotundifolia*, et dans une moindre mesure chez IRAC 2292, les tubes germinatifs ont une longueur plus importantes que ceux produits chez les espèces sensibles, témoignant d'une non-reconnaissance immédiate de l'hôte. Les appressoria montrent une superposition de nombreux lobes, indiquant vraisemblablement une tentative répétée de pénétration. Un essai immédiat à proximité d'un premier lobe expliquerait cet enchevêtrement, afin de réduire le métabolisme

énergétique restreint aux seules réserves de la conidie. Lorsque les stades "premier et second hyphe" sont atteints sur *M. rotundifolia* et IRAC 2292, les appressoria apparaissent normaux mais se trouvent extrêmement rapprochés sur un même hyphe. Si les premiers établissements d'haustoria ont réussi, le développement de nouveaux sites d'infection peut être inhibé par l'activation de mécanismes de défense. Doster et Schnathorst (1985b) rapportent que la formation "multiple" d'appressoria s'observe plus fréquemment sur des cultivars résistants, et présumant de l'échec de l'établissement fonctionnel de l'haustorium à partir du premier appressorium. Toutefois, ce phénomène semble également se produire sur des hyphes âgés observés sur les cépages sensibles. Le premier haustorium devenant moins fonctionnel dans le temps, d'autres haustoria sont initiés afin d'optimiser l'apport de nutriments (Leinhos *et al.*, 1997).

L'arrêt de la croissance végétative du pathogène s'observe très rapidement (stade "appressorium primaire" pour *V. candidans*, stade "premier et second hyphe" pour *M. rotundifolia*), supposant que la pénétration de la cuticule est extrêmement réduite et/ou les haustoria ne sont pas fonctionnels au sein des cellules épidermiques. Boubals (1961) conçoit la notion d' "immunité stricte" pour de telles espèces dans son évaluation de la résistance à l'oïdium chez les Vitacées. Par conséquent, l'observation des structures de reproduction sexuée ne peut être attendue sur ces espèces.

La croissance d'*E. necator* sur des espèces de vigne sensibles est caractérisée par une chronologie de différenciation des structures infectieuses. L'implantation d'un haustorium fonctionnel est le stade primordial, conditionnant la poursuite du développement fongique. La conidie semble également jouer un rôle crucial par sa capacité à diriger le flux cytoplasmique, permettant l'émergence des différents hyphes (Leinhos *et al.*, 1997). Le suivi des infections *in vitro* est en accord avec le degré de sensibilité évalué au champ pour les différents espèces et cultivars étudiés et correspond globalement à l'évaluation réalisée par d'autres auteurs, malgré une variabilité inhérente aux conditions climatiques, à l'individu et à l'inoculum (Doster et Schnathorst, 1985b). La révélation de différents niveaux de résistance parmi les espèces sélectionnées permet la détermination d'un modèle "sensibilité-résistance" pour l'étude de la manifestation des réactions de défense contre le pathogène. Ces différences de développement du champignon sur les hôtes étudiés traduisent une variabilité de la réponse de défense mise en jeu par l'hôte dès la reconnaissance du pathogène.

Chapitre II : Contribution des cires cuticulaires dans la résistance à *Erysiphe necator*

1 Introduction

La surface de chaque plante est tapissée spécifiquement d'un enchevêtrement complexe plus ou moins épais de matériels hydrophobes, contenant des composés aliphatiques à longues chaînes. Cette couche de cires cuticulaires peut être extraite spécifiquement par des solvants organiques afin d'en analyser la composition chimique. Toutefois, les cires de surface (couche épicuticulaire) et les cires associées à la matrice de cutine (couche intracuticulaire) ne peuvent être distinguées. L'extrait global est le reflet de la composition chimique de surface, à condition que les deux couches aient une composition chimique similaire (Gniwotta *et al.*, 2005). C'est l'emploi d'un adhésif à base de polymère de gomme arabique qui a permis pour la première fois, d'extraire spécifiquement les cires de surface (Jetter *et al.*, 2000). La gomme arabique est un polysaccharide acide fortement ramifié qui se présente sous la forme de mélanges de sels de potassium, de magnésium et de calcium, agglomérés par des monomères de D-galactose, le L-arabinose, le L-rhamnose et l'acide D-glucuronique, formant l'acide arabique (FAO, 1999). Une extraction chimique consécutive permet alors de différencier les cires épicuticulaires (CE) des cires intracuticulaires (CI). Cette technique d'échantillonnage a été employée afin de caractériser les interactions chimiques des premières étapes de la relation plante-pathogène (Gniwotta *et al.*, 2005; Zabka *et al.*, 2008).

Les cires épicuticulaires constituent la première barrière physique entre le pathogène et son hôte. S'il y a reconnaissance de la surface de la plante, la conidie germe et se différencie en appressorium. De nombreux pathogènes fongiques élaborent des structures infectieuses spécialisées afin d'accomplir l'infection et la colonisation des tissus de l'hôte (Mendgen *et al.*, 1996). Le caractère biotrophe des oïdiums ainsi que les faibles réserves énergétiques présentes dans les spores, impliquent une reconnaissance rapide des stimuli de surface de l'hôte afin d'initier la germination et la formation des structures fongiques spécialisées (Carver *et al.*, 1990; Tsuba *et al.*, 2002; Gniwotta *et al.*, 2005; Zabka *et al.*, 2008). Toutefois, la nature du signal induisant ce programme de différenciation est peu compris (Kolattukudy *et al.*, 1995). De nombreux travaux ont montré que les caractéristiques topographiques de surface ou des stimuli chimiques étaient impliqués dans ce processus de différenciation des organes fongiques. Si les facteurs abiotiques (température, taux d'hygrométrie) liés au développement fongique sont bien connus et maîtrisés *in vitro*, les signaux spécifiques à la formation

d'appressorium restent étroitement liés au pathosystème (Hedge et Kolattukudy, 1997). Les rouilles des céréales, par exemple, nécessitent un stimulus physique, orientant le tube germinatif dans la recherche des stomates (Staples, 1983; Vaz Patto et Niks, 2001). Ce thigmotropisme constitue un avantage pour le pathogène puisqu'en maintenant une orientation perpendiculaire de croissance du tube germinatif, il maximise ses chances de rencontre des stomates, organisés en rangs sur la feuille (Gow, 1993). Au contraire, la formation de l'appressorium de *Colletotrichum gloeosporioides* semble dépendante d'un signal chimique (Podila *et al.*, 1993), car des faibles concentrations de cires cuticulaires d'avocat (*Persea americana*) désorganisées par sonication sont capables d'induire la différenciation d'appressoria. L'étude de la résistance de *Pinus strobus* à la rouille a démontré l'association des deux types de signaux (Smith *et al.*, 2006). Les cires épicuticulaires de génotypes résistants sont impliquées tant physiquement par l'occlusion des stomates, que chimiquement, par la réduction de la germination des spores de *Cronartium ribicola*.

Certains pathogènes sont capables de rester à l'état latent sur l'hôte et d'utiliser des signaux chimiques particuliers comme inducteur de la différenciation des structures infectieuses. L'éthylène, hormone de maturation des fruits, est ainsi employée par *Colletotrichum* sp. pour la formation d'appressoria et la dichotomisation des hyphes (Kolattukudy *et al.*, 1995). La surface des conidies de *Magnaporthe grisea* contient un auto-inhibiteur de formation d'appressorium, dont l'effet est réprimé lors du contact avec les cires épicuticulaires de la plante hôte (Hedge et Kolattukudy, 1997).

Les cires épicuticulaires peuvent naturellement être des composés fongitoxiques par elles-mêmes. La germination du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* est plus importante et rapide sur certaines espèces de Crucifères, dont les cires épicuticulaires ont été supprimées de la surface foliaire, suggérant la présence de composés fongistatiques dans les cires (Inyang *et al.*, 1999). Yang *et al.* (1993) ont observé une forte corrélation entre la composition chimique des lipides foliaires de cultivars d'arachide (*Arachis hypogaea*) et la résistance à certains insectes phytophages. Les cires épicuticulaires de graines d'orge (*Hordeum vulgare*) contiennent des quantités variables de 5-(n)-alkylresorcinol, composés qui confèrent une résistance à *Aspergillus niger* et *Penicillium crysogenum* (García *et al.*, 1997).

La connaissance de la morphologie et de la composition chimique des cires de surface permet d'expliquer les différences de sensibilité observées chez les espèces végétales (Lyngs Jørgensen *et al.*, 1995). Dans ce travail, l'analyse chimique et morphologique des cires cuticulaires a été entreprise sur deux espèces modèles de *Vitis*, *V. vinifera* cv Chasselas et *V. candicans*, respectivement sensible et résistant à l'oïdium, afin d'évaluer la participation de ce film hydrophobe dans les premières étapes de l'interaction hôte-pathogène. La contribution des cires cuticulaires au mécanisme de résistance de la vigne

à l'oïdium a été évaluée afin d'analyser la composition chimique des cires cuticulaires des deux espèces de *Vitis* et d'estimer la contribution des couches de CE et CI dans la quantité totale des cires de surface. D'autre part, les cires ont été caractérisées qualitativement entre les deux espèces en relation avec leur sensibilité à l'oïdium. Le travail s'est également porté sur la compréhension du rôle des structures de surface dans la reconnaissance spécifique hôte-pathogène, et notamment, le comportement du pathogène à la surface de l'hôte après suppression des CE. L'étude s'est conclue par une tentative de détermination et de localisation d'un ou plusieurs composés stimulateurs et/ou inhibiteurs de la différenciation des structures infectieuses.

2 Résultats

2.1 Extraction chimique

Dans une première expérience, la quantité totale de cires cuticulaires des espèces *V. vinifera* cv. Chasselas et *Vitis candicans* a été déterminée par extraction au chloroforme d'une surface foliaire déterminée. *V. candicans* présente une quantité de cires cuticulaires ($57.65 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 6.66$) significativement supérieure ($P=0.014$) au Chasselas ($15.51 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 9.96$) (Tableau 2).

La composition qualitative des cires cuticulaires des deux cultivars testés est similaire en proportion relative. Les alcools primaires dominant avec 45.5 et 57.7 % de la quantité totale de cires respectivement chez *V. vinifera* cv Chasselas et *V. candicans*. Ce dernier présente une quantité significativement plus élevée d'alcanes ($P=0.022$) et d'acides gras ($P=0.004$). Les esters n'ont été détectés que chez *V. candicans* mais en quantité extrêmement faible (0.1%). La famille des aldéhydes et des composés non identifiés sont en proportion absolue analogue chez les deux cultivars. Ces derniers incluent des composés identifiés par comparaison de spectres de masses issus de bases de données mais dont la présence dans un système biologique demeure incertain (phénylméthylester dans le cas de *V. vinifera* cv Chasselas, 1-octadecanethiol et esters d'acide benzoïque dans le cas de *V. candicans*).

Dans les cires cuticulaires extraites, 26 et 33 composés chimiques ont été identifiés, dont 18 et 21 ont été quantifiés, respectivement chez *V. vinifera* cv Chasselas et *V. candicans*. Les alcanes ne sont représentés que par des longueurs de chaîne impaires avec une prédominance pour le nonacosane (29 atomes de carbone) et l'heneitriacontane (31 atomes de carbone) (Tableau 2). Seul *V. candicans* présente des alcanes en C_{27} et C_{33} , toutefois en faible quantité. Si les aldéhydes ont pu être identifiés et quantifiés, la caractérisation de la longueur de chaîne n'a pas été réalisée faute de standards. Cette famille chimique regroupe 4 à 5 composés de longueur de chaîne différente dont la représentation et la quantité sont semblables chez les deux cultivars testés.

Tableau 2 Composition des cires cuticulaires selon la longueur de chaîne carbonée et la classe chimique des composés identifiés provenant de la surface adaxiale de feuilles de *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*. Les valeurs des composés appartenant à différentes classes chimiques sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type, ainsi qu'en pourcentage de la quantité totale de cires cuticulaires. Les différences significatives ($P \leq 0.05$) ont été déterminées par analyse de variance à un facteur, suivi d'un test *post hoc* de Tukey HSD. Une lettre différente au sein d'une même classe chimique indique une différence significative entre les deux cultivars.

	<i>V. vinifera</i> cv Chasselas		<i>V. candicans</i>	
	$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	$\mu\text{g cm}^{-2}$	%
Quantité totale de cires cuticulaires	15.51^b $\pm$ 9.96		57.65^a $\pm$ 6.66	
Alcanes	0.90^b $\pm$ 1.08	5.8	4.46^a $\pm$ 0.77	7.7
27			0.05 $\pm$ 0.01	0.1
29	0.10 $\pm$ 0.04	0.6	1.35 $\pm$ 1.33	2.3
31	0.80 $\pm$ 1.04	5.2	2.90 $\pm$ 0.93	5.0
33			0.16 $\pm$ 0	0.3
Alcools primaires	7.05^b $\pm$ 3.59	45.5	33.26^a $\pm$ 10.14	57.7
22	0.04 $\pm$ 0	0.3	0.12 $\pm$ 0.03	0.2
24	0.29 $\pm$ 0.12	1.9	1.15 $\pm$ 0.15	2.0
26	2.17 $\pm$ 1.47	14.0	10.52 $\pm$ 3.23	18.2
28	2.42 $\pm$ 1.60	15.6	13.21 $\pm$ 4.3	22.9
30	1.32 $\pm$ 0.59	8.5	6.80 $\pm$ 1.97	11.8
32	0.81 $\pm$ 0.23	5.2	1.45 $\pm$ 0.76	2.5
Aldéhydes	1.37 $\pm$ 0.54	8.8	1.49 $\pm$ 0.77	2.6
Acides gras	1.78^b $\pm$ 1.29	11.5	8.87^a $\pm$ 0.87	15.4
16	0.27 $\pm$ 0.38	1.7	1.15 $\pm$ 0	2.0
18	0.06 $\pm$ 0.07	0.4	0.23 $\pm$ 0.38	0.4
20			0.27 $\pm$ 0	0.5
22			0.68 $\pm$ 0	1.2
24	0.05 $\pm$ 0.01	0.3	3.33 $\pm$ 1.61	5.8
26	0.73 $\pm$ 0.93	4.7	3.31 $\pm$ 1.92	5.7
28	0.67 $\pm$ 0.80	4.3	0.67 $\pm$ 0.36	1.2
Esters	0	0.0	0.06 $\pm$ 0.04	0.1
Triterpènes	1.32 $\pm$ 1.44	8.5	5.91 $\pm$ 2.86	10.3
β -tocophérol	0.17 $\pm$ 0.04	1.1	2.22 $\pm$ 1.86	3.9
γ -tocophérol	1.07 $\pm$ 1.51	6.9	2.17 $\pm$ 3.76	3.8
3- β -Lup-20(29)-en-3-ol acétate	1.29 $\pm$ 0.24	8.3		
germanicol			1.52 $\pm$ 0.67	2.6
β -amyrine	0.08 $\pm$ 0.03	0.5		
Non identifiés	3.09 $\pm$ 2.01	19.9	3.60 $\pm$ 1.75	6.2

Dans la famille des acides gras, la longueur de chaîne varie de 16 à 28 atomes de carbone avec une quantité maximale pour l'acide tétracosanoïque et hexacosanoïque, représentant chacun 5.7% de la quantité totale de cires de *V. candicans*. Les alcools primaires sont majoritaires au sein des cires cuticulaires. Si les longueurs de chaîne

varient de 22 à 32 atomes de carbone, l'hexacosanol et l'octacosanol sont les composés les plus abondants, respectivement 14% et 15.6% chez *V. vinifera* cv Chasselas et 18.2% et 22.9% chez *V. candicans*. Chez ce dernier, les alcools en C₂₆ (10.52 µg cm⁻²), C₂₈ (13.21 µg cm⁻²) et C₃₀ (6.8 µg cm⁻²) représentent à eux-seuls 53% de la quantité totale de cires cuticulaires extraites. La classe des triterpènes contient des composés trouvés spécifiquement sur les espèces testées: si le 3-β-Lup-20(29)-en-3-ol acetate et le β-amyrine sont propres à *V. vinifera* cv Chasselas, le germanicol n'est présent que chez *V. candicans*. Les formes β et γ du tocophérol ont été identifiées dans les deux génotypes mais en quantité nettement supérieure chez *V. candicans* (4.4 µg cm⁻² contre 1.2 µg cm⁻² pour *V. vinifera* cv Chasselas).

2.2 Extraction sélective des cires épicuticulaires et intracuticulaires

La séparation des deux couches de cires cuticulaires a été réalisée par la combinaison d'un décapage mécanique répété au moyen de gomme arabique, suivie d'une extraction chimique finale. L'application répétée de gomme arabique décroît la quantité de cires, scellées dans le polymère (Figure 17). Trois traitements sont réalisables, le dessèchement partiel de la surface soumise à l'extraction empêche toute autre application de gomme arabique.

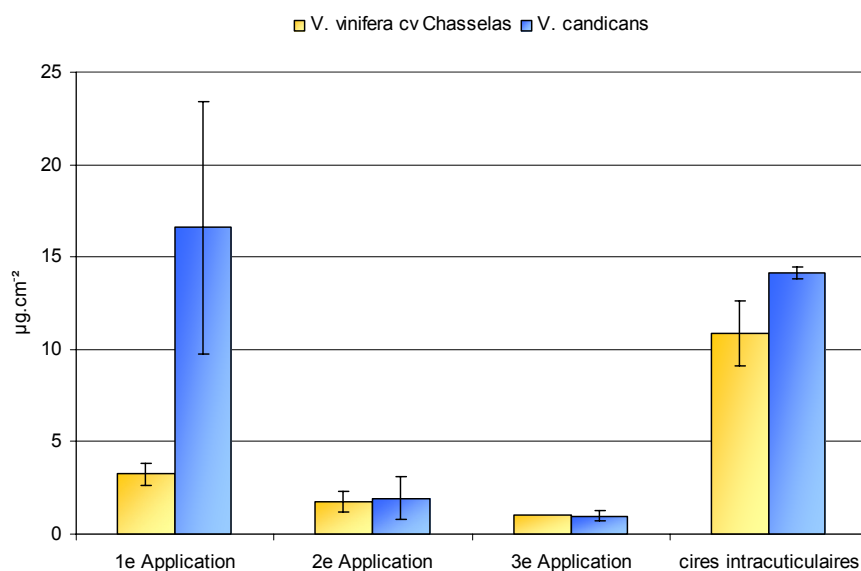


Figure 17 Quantités de cires épicuticulaires et intracuticulaires de *V. vinifera* cv Chasselas et *V. candicans* extraites après trois applications successives de gomme arabique, puis une extraction chimique finale.

Le cumul des quantités de cires ainsi obtenues (CE via trois extractions mécaniques et CI suite à une extraction chimique finale) avoisine la quantité totale mesurée par la méthode d'extraction chimique globale, soit $16.38 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 3.71$ pour le Chasselas, et $33.66 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 7.99$ pour *V. candicans*. La majorité des cires épicuticulaires de *V. candicans* sont supprimées lors de la première extraction puisqu'elle représente 85% des cires extraites mécaniquement.

Le rapport "cires épicuticulaires / cires intracuticulaires" (Tableau 3) indique que les CE ne constituent qu'un tiers des cires totales du Chasselas, tandis qu'elles sont majoritaires (58%) chez *V. candicans*. Les quantités de CI sont du même ordre de grandeur chez les deux espèces étudiées, soit $10.86 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 1.78$ pour *V. vinifera* cv Chasselas et $14.16 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 0.32$ pour *V. candicans*.

Tableau 3 Quantification des cires cuticulaires ($\mu\text{g cm}^{-2}$) foliaires en fonction de leur localisation chez *V. vinifera* cv Chasselas et *V. candicans*.

Echantillon	Chasselas	<i>Vitis candicans</i>
Cires épicuticulaires (après 3 extractions)	5.52 ± 1.93	19.50 ± 8.31
Cires intracuticulaires	10.86 ± 1.78	14.16 ± 0.32
Ratio cires épicuticulaires / intracuticulaires	0.56	1.38

2.3 Microscopie électronique

L'espèce *V. vinifera* cv. Chasselas présente une surface lisse malgré quelques protubérances éparses donnant un aspect "croulé" typique. Chez *V. candicans*, la surface est couverte d'un enchevêtrement de cristaux en forme de petite assiette (Figure 18). L'épaisseur et le motif de cristallisation sont confirmés par les observations faites au microscope électronique à transmission. Cette même technique a été appliquée sur des cépages de sensibilité variable au pathogène, à savoir *V. vinifera* cv Pinot Noir, les hybrides interspécifiques IRAC 1999 et 2292 et le genre *Ampelopsis* (Figure 18), ce qui permet de corréler le motif de cristallisation des cires de surface et la sensibilité observée à l'oïdium. La suppression des cires épicuticulaires par le polymère de gomme arabique est confirmée par l'observation des échantillons traités, au MEB (Figure 19). L'application de l'adhésif permet de figer la majorité des cristaux de CE dans la gomme arabique. Le retrait de l'adhésif supprime ces cristaux de la surface foliaire, et la quantité de CE ainsi extraite (analysée par GC, Figure 17) est corrélée à l'observation microscopique. Les surfaces foliaires après traitement au chloroforme ne présentent plus aucuns cristaux de cires (Figure 19).

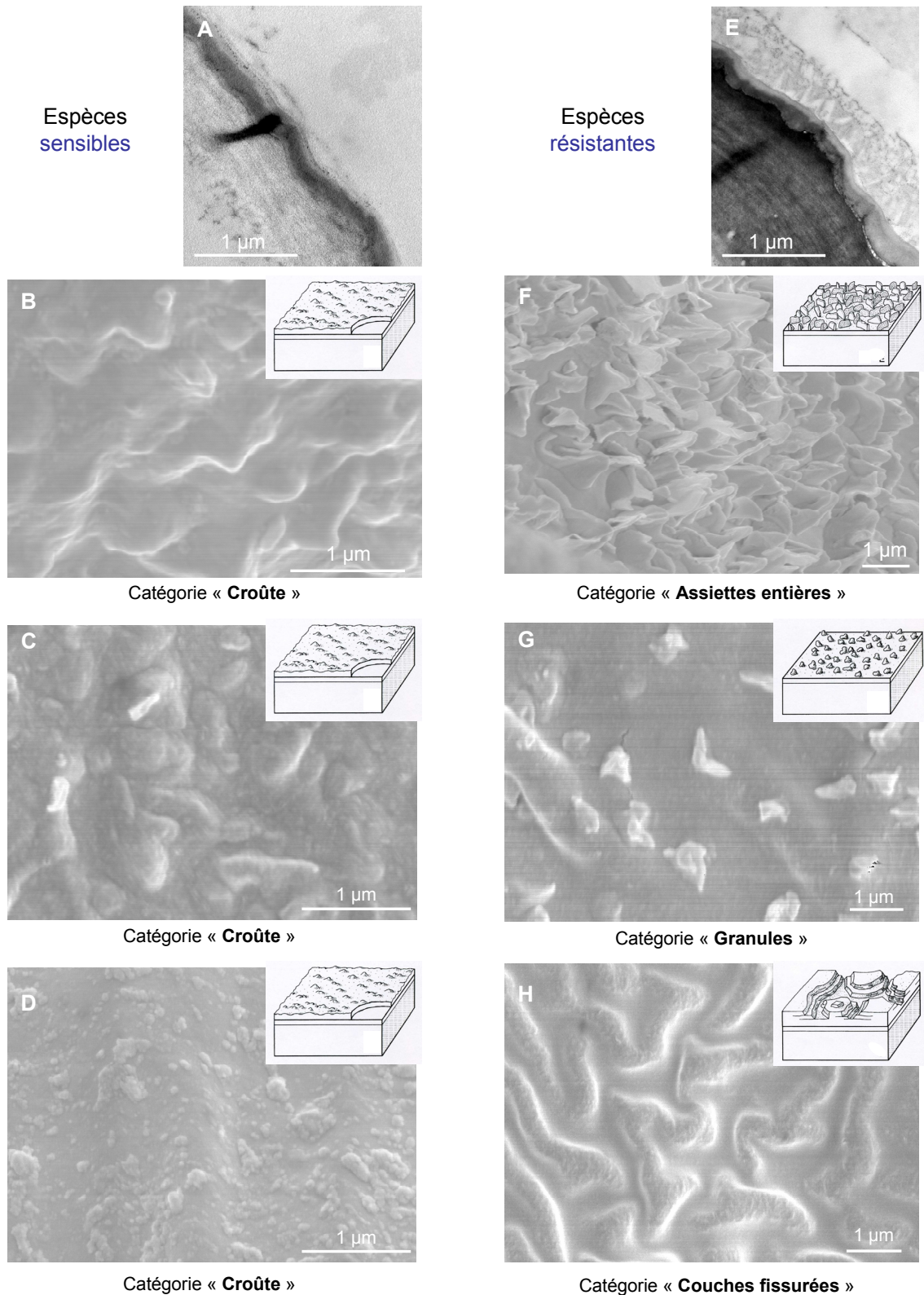


Figure 18 Observations au MET et au MEB des motifs de cristallisation de la surface adaxiale de feuilles d'espèces sensibles et résistantes à *E. necator*. A et E: Observation au MET d'une coupe transversale de cuticule de *V. vinifera* cv Chasselas (A) et *V. candicans* (E). B-D et F-H: Observation au MEB des surfaces avec les schémas respectifs des catégories de CE correspondant à la classification de Barthlott *et al.* (1998). B: *V. vinifera* cv Chasselas, C: *V. vinifera* cv Pinot Noir, D: IRAC 1999, F: *V. candicans*, G: IRAC 2292, H: *Ampelopsis heterophylla*.

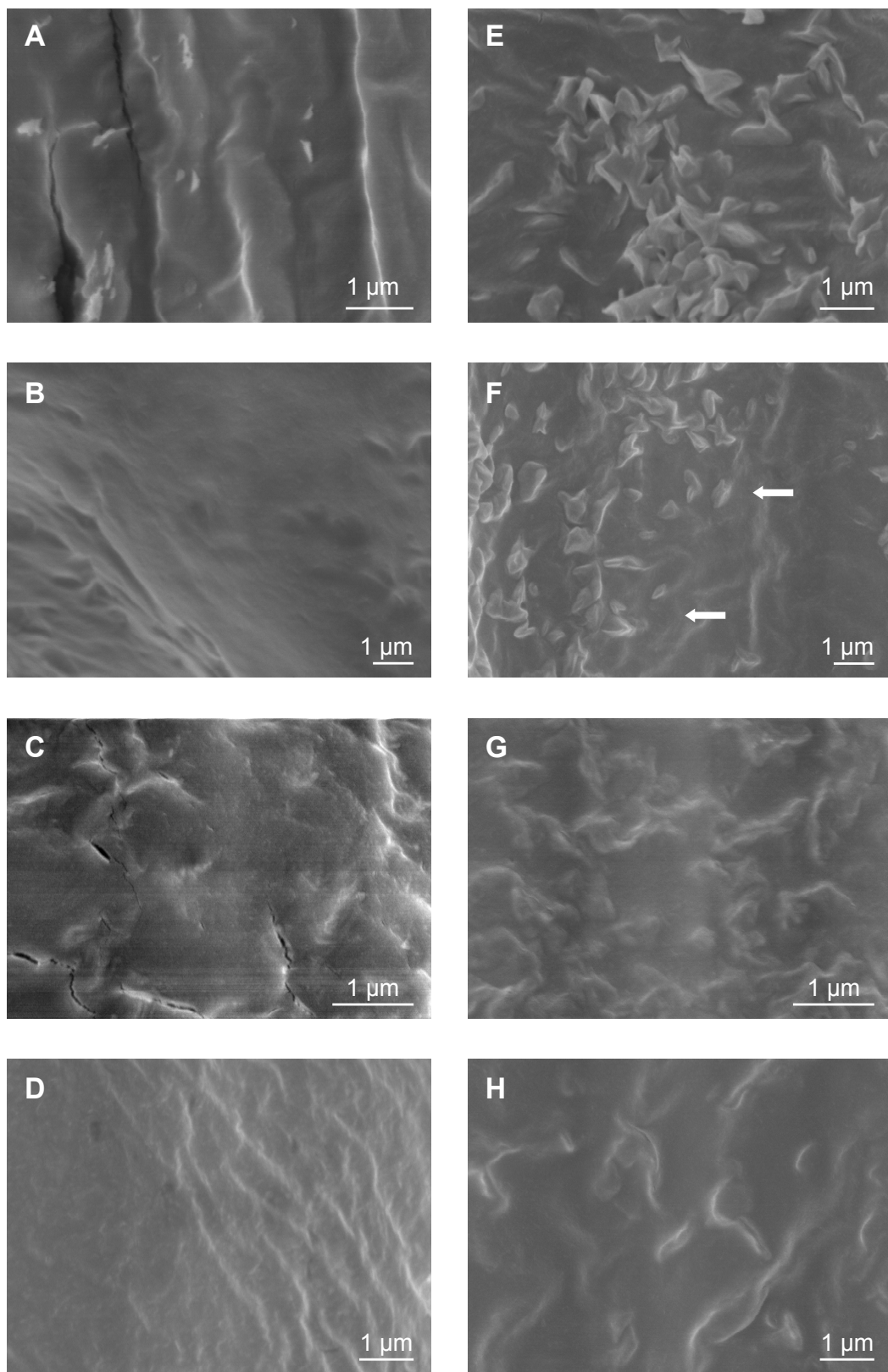


Figure 19 Observation au MEB de la surface adaxiale foliaire après traitement à la gomme arabique (suppression des cires épicuticulaires) et traitement au chloroforme (suppression des cires cuticulaires totales). A-D: *V. vinifera* cv Chasselas; E-H: *V. candicans*. A, E: Témoin non traité; B, F: Surface foliaire après suppression des CE, limite visible (flèches) entre la zone traitée et non-traitée; C, G: Couche de CE scellées dans la gomme arabique; D, H: Surface après extraction totale des CE au chloroforme.

2.4 Composition des cires épicuticulaires et intracuticulaires

L'utilisation conjointe de décapage mécanique et d'extraction chimique, afin de distinguer les deux couches de cires cuticulaires, a permis de détecter les mêmes composés chimiques. Toutefois, des différences apparaissent entre les CE et CI d'un même cépage et entre les deux cépages cultivés (Tableau 4).

Tableau 4 Composition absolue ($\mu\text{g cm}^{-2}$) et relative (%) des cires épicuticulaires et intracuticulaires de la surface adaxiale de feuilles de *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*. Les valeurs des composés appartenant à différentes classes chimiques sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type, ainsi qu'en pourcentage de la quantité totale de cires cuticulaires. Les différences significatives ($P\text{-value} \leq 0.05$) ont été déterminées par analyse de variance à un facteur, suivi d'un test *post hoc* de Tukey HSD. Une lettre différente au sein d'une même classe chimique indique une différence significative entre les deux cultivars (nd : non détecté).

<i>V. vinifera</i> cv Chasselas		1 ^e extraction mécanique		CE		CI	
Classe chimique		$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	$\mu\text{g cm}^{-2}$	%
Alcanes		0.47 ± 0.14	14.4	$0.75^{ab} \pm 0.3$	13.5	$0.75^{ab} \pm 0.33$	6.9
Aldéhydes		0.012 ± 0	0.4	$0.01^b \pm 0.0$	0.2	$0.13^b \pm 0.07$	1.2
Acides gras		0.42 ± 0.15	12.9	0.66 ± 0.31	12.0	0.94 ± 0.01	8.6
Alcools primaires		1.87 ± 0.7	57.8	3.05 ± 1.6	55.3	8.35 ± 2.23	76.9
Triterpènes		nd		nd		$0.54^b \pm 0.07$	5.0
Non identifiés		0.47 ± 0.38	14.5	1.05 ± 0.27	19.0	0.16 ± 0.13	1.5
<i>V. candicans</i>		1 ^e extraction mécanique		CE		CI	
Classe chimique		$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	$\mu\text{g cm}^{-2}$	%	$\mu\text{g cm}^{-2}$	%
Alcanes		1.49 ± 0.06	9.0	$1.74^a \pm 0.2$	8.9	$0.20^b \pm 0.05$	1.4
Aldéhydes		0.44 ± 0.12	2.6	$0.47^a \pm 0.14$	2.4	$0.20^{ab} \pm 0.02$	1.4
Acides gras		3.45 ± 2.09	20.8	4.07 ± 2.32	20.9	0.94 ± 0.35	6.7
Alcools primaires		10.32 ± 5.84	62.2	12.28 ± 7.02	63.0	10.30 ± 1.16	72.7
Triterpènes		nd		nd		$2.47^a \pm 1.24$	17.4
Non identifiés		0.88 ± 1.02	5.3	0.93 ± 1.09	4.8	0.06 ± 0.03	0.4

La proportion d'alcanes et d'acides gras est plus importante dans les CE, notamment chez *V. candicans* ($P=0.014$). Même s'ils représentent une faible quantité dans la composition des cires, la concentration en aldéhydes est significativement plus élevée dans les CE de *V. candicans* ($P = 0.017$). Les alcools primaires s'accumulent préférentiellement dans les CI, où leur proportion atteint 76.9% et 72.7% respectivement chez le *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*. La famille des triterpènes n'apparaît que dans les CI et en concentration significativement supérieure chez *V. candicans* ($P=0.044$). Les composés non identifiés représentent une plus grande part des CE, tandis qu'ils sont en très faible quantité dans les cires des couches sous-jacentes, assurant une bonne détermination qualitative de la composition des CI. L'analyse chimique de la première extraction mécanique présente des proportions très similaires à la composition globale des CE.

Au sein des différentes classes chimiques, les CE et CI montrent une distribution de longueur de chaîne semblable à celle observée sur l'extrait total de cires cuticulaires (Figure 20).

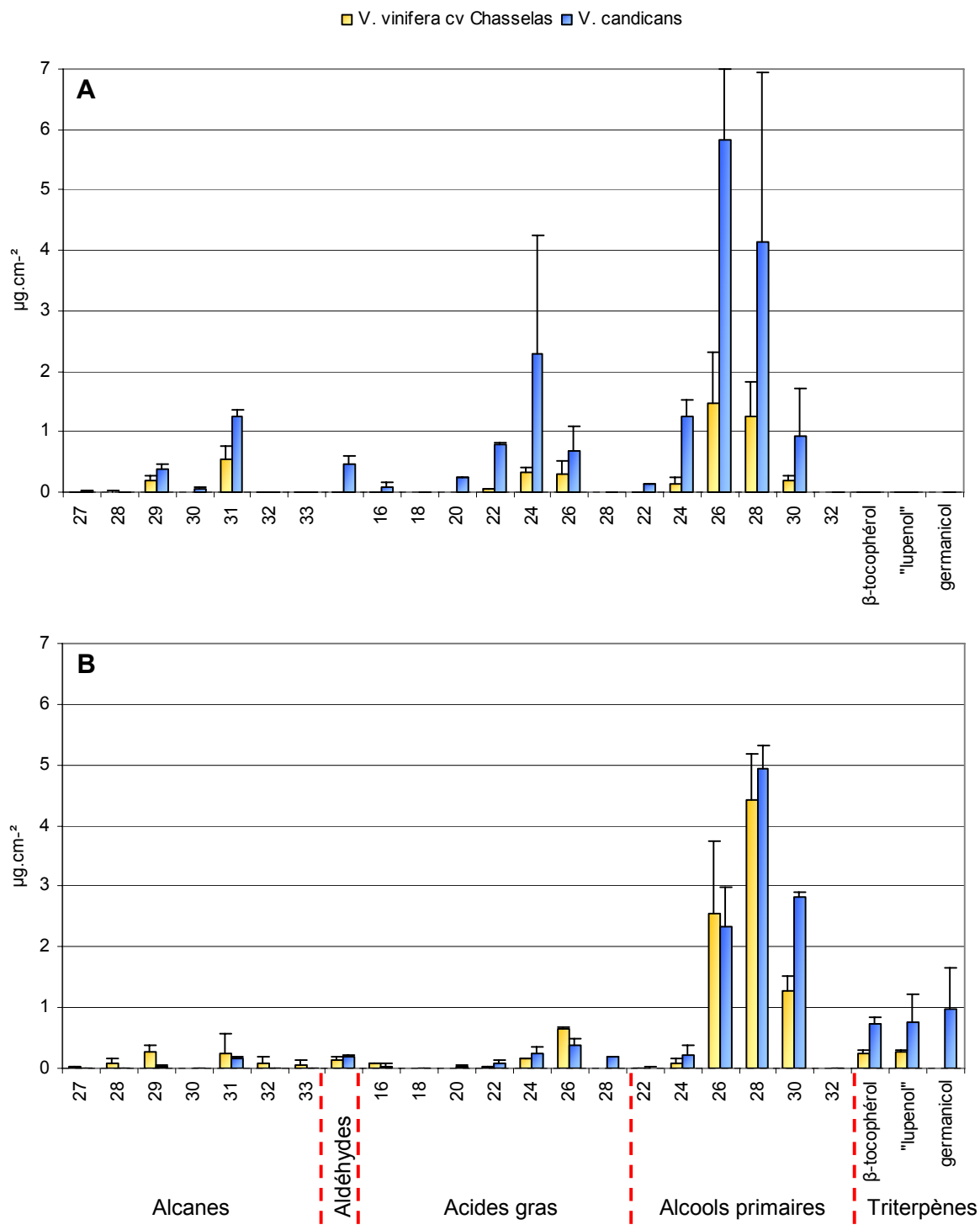


Figure 20 Composition des cires épicuticulaires (A) et intracuticulaires (B) selon la longueur de chaîne carbonée et la classe chimique des composés identifiés chez *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*.

L'hexacosanol est majoritaire ($5.82 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 2.32$) suivi par l'octocosanol ($4.13 \mu\text{g cm}^{-2} \pm 4.93$) chez les CE de *V. candidans* tandis que le ratio est inversé au niveau des CI, avec respectivement $4.93 \mu\text{g cm}^{-2} (\pm 0.39)$, $2.82 \mu\text{g cm}^{-2} (\pm 0.7)$ et $2.32 \mu\text{g cm}^{-2} (\pm 0.65)$ pour l'octocosanol, le triacontanol et l'hexacosanol. Les acides gras chez *V. candidans* sont dominés par l'acide tétracosanoïque avec $2.29 \mu\text{g cm}^{-2} (\pm 1.95)$, la quantité d'acide hexacosanoïque étant inférieure à celle de l'extrait global.

La répartition des composés constitutifs des CI est relativement similaire entre les deux espèces de *Vitis*, principalement composés d'alcools primaires et de triterpènes spécifiques. Les aldéhydes sont essentiellement situés dans les CI chez le Chasselas.

2.5 Composition des cires épicuticulaires et phases initiales d'infection par *E. necator*

La relation entre la composition des cires épicuticulaires et les premières phases d'infection par *E. necator* a été analysée. La notation s'est portée sur les deux principaux événements de pré-pénétration fongique à savoir le taux de germination et la différenciation du tube germinatif en appressorium (Figure 21). Sur *V. candidans*, le pathogène présente un taux de germination et de formation d'appressoria significativement plus faible que sur *V. vinifera* cv Chasselas, respectivement 57% contre 32% et 44% contre 17%. Après extraction des CE sur l'espèce résistante, le niveau de germination et de formation d'appressoria atteint le niveau de l'espèce sensible. A l'inverse, la suppression des CE sur *V. vinifera* cv Chasselas a tendance à réduire le taux de germination (47%) et à restreindre significativement la différenciation en appressorium du tube germinatif (28.5%). Les surfaces artificielles de gomme arabique recouvertes par les cristaux de CE présentent un taux de germination similaire à celui observé sur les feuilles infectées non traitées. Cependant, la formation d'appressoria est extrêmement réduite, même si la présence de CE de Chasselas permet un taux significativement plus élevé par rapport à celles de *V. candidans*. Si la gomme arabique pure permet d'obtenir un pourcentage de germination analogue à l'espèce sensible, aucun appressorium n'a pu être observé.

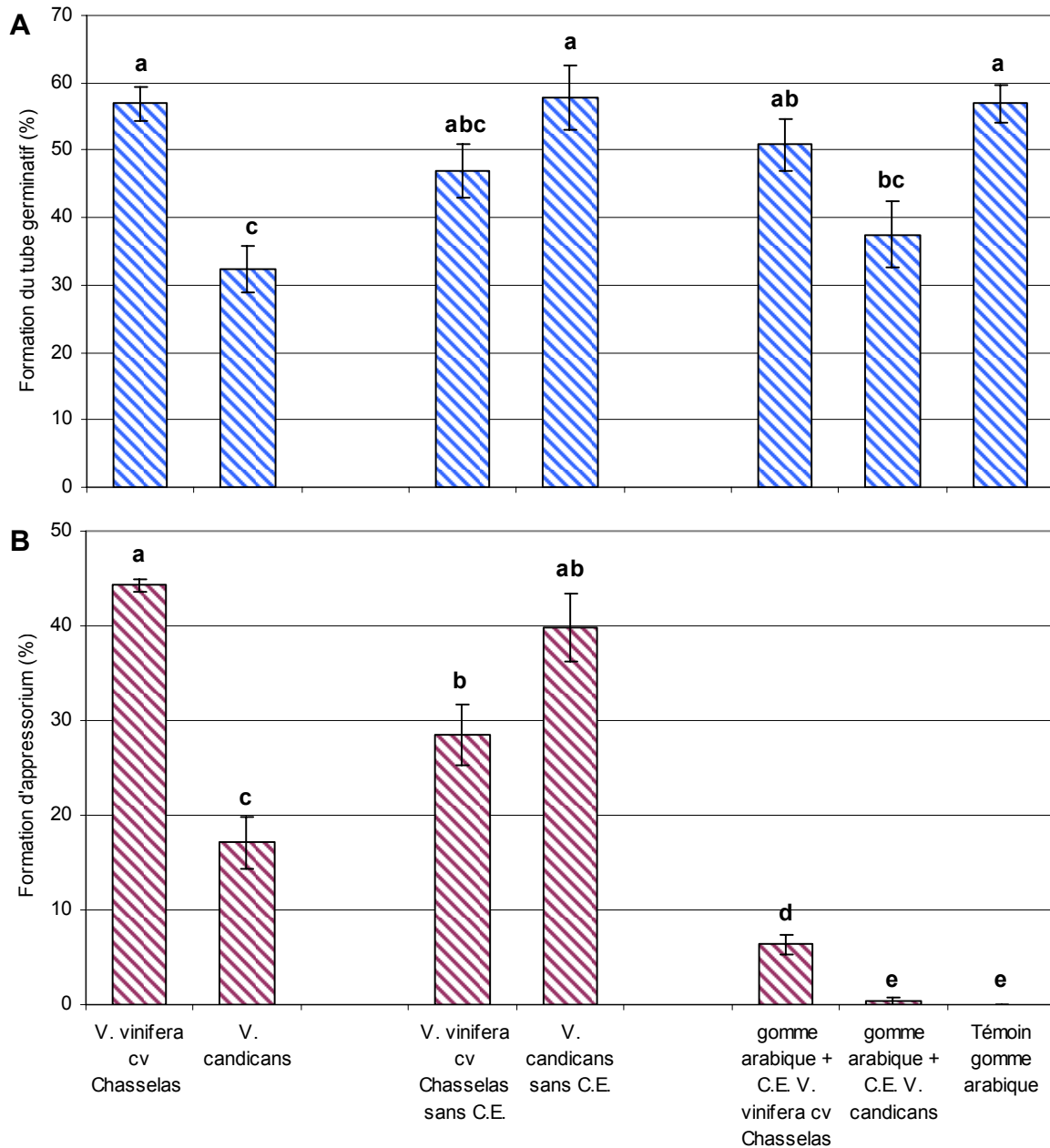


Figure 21 Premiers stades de développement d'*E. necator* à la surface adaxiale de *V. vinifera* cv. Chasselas et de *V. candicans*; après suppression de la couche de cires épicuticulaires par traitement à la gomme arabique. Les échantillons de gomme arabique avec ou sans cires épicuticulaires ont également été observés. Le pourcentage de germination des conidies (émergence d'un tube germinatif) (A) et le pourcentage de formation d'appressorium (B) représentent la moyenne du comptage de 150 à 200 conidies $\pm$ l'erreur standard (répété trois fois). Une transformation "arcsinus" des données a été réalisée avant une analyse de variance à un facteur. Une lettre différente indique une différence significative ($P \leq 0.05$), déterminée par le test *post hoc* de Tukey HSD.

2.6 Effet de fractions de cires de *V. vinifera* cv. Chasselas et de *V. candicans* sur le développement d'*E. necator*.

Les pourcentages de germination et de formation d'appressoria observés sur lames gélosées recouvertes de cires cuticulaires extraites sont identiques à ceux évalués sur les feuilles des deux espèces étudiées (Figure 21A et B; Tableau 5). La fraction "alcools primaires et triterpènes" permet un taux maximum de germination avec respectivement 48 et 56% pour *V. vinifera* cv. Chasselas et de *V. candicans*. Sur l'ensemble des fractions, le taux d'induction de la formation d'appressoria est compris entre 0 et 26%, indépendamment de l'espèce considérée. Les alcanes présentent les valeurs de germination et de formation d'appressoria les plus faibles.

Tableau 5 Taux de germination et de formation d'appressoria d'*E. necator* sur différents supports de développement.

Extraits	Germination (%)	Appressorium formé (%)
Agar	72	10
Agar + chloroforme	62	30
Agar + cires cuticulaires de <i>V. vinifera</i> cv Chasselas	65	52
Agar + cires cuticulaires de <i>V. candicans</i>	29	16

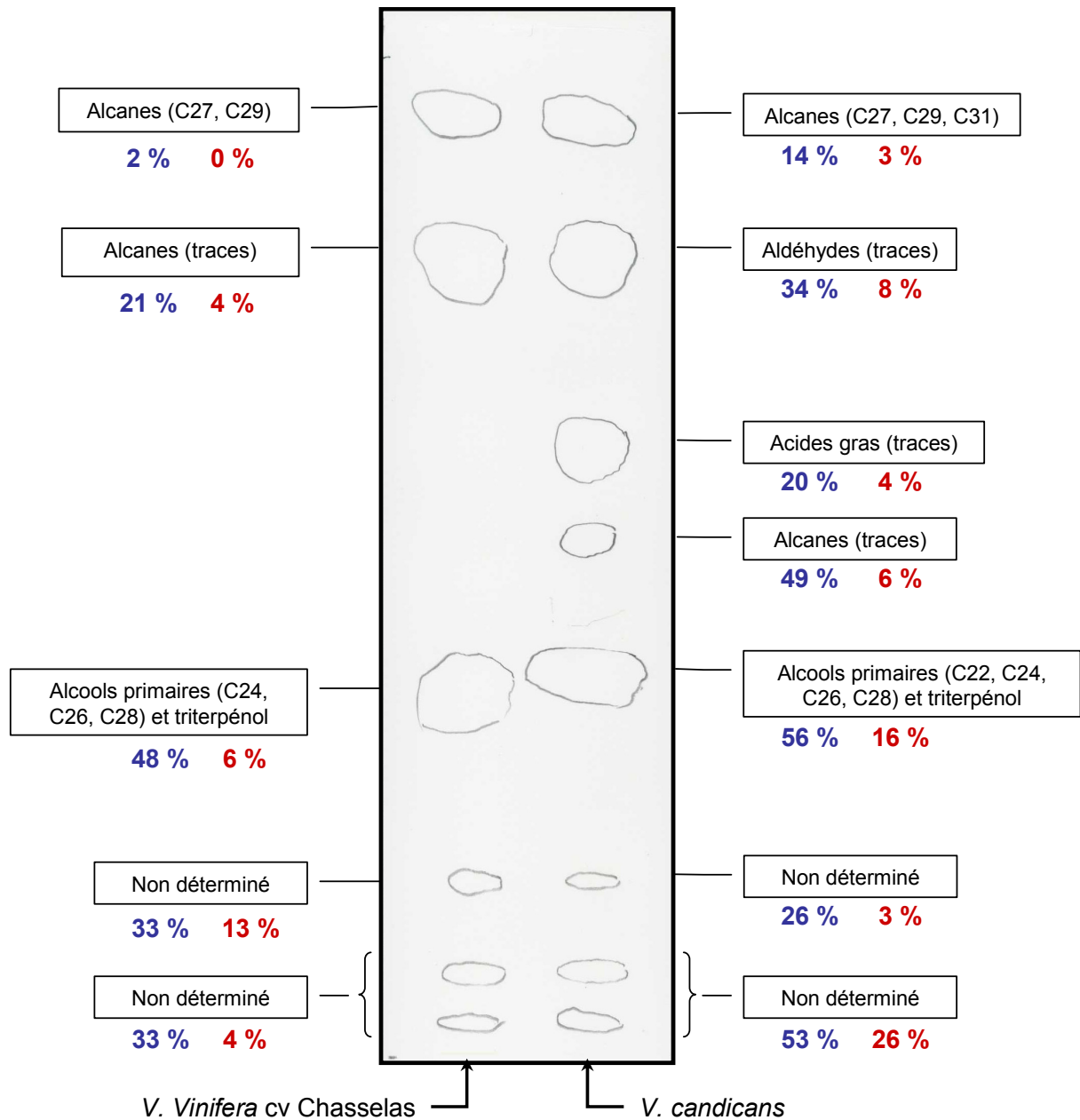


Figure 22 Chromatographie en couche mince de cires cuticulaires extraites au chloroforme de *V. vinifera* cv. Chasselas et de *V. candicans*. L'identification chimique des fractions isolées est mentionnée, ainsi que les composés majoritaires. L'activité d'induction des différentes fractions est précisée par le pourcentage de germination (bleu) et le pourcentage de formation d'appressorium (rouge), observés sur lames gélosées recouvertes de l'extrait.

3 Discussion

3.1 Méthodes analytiques

La composition chimique et l'agencement spatial des cires cuticulaires de deux espèces de *Vitis* ont été analysés, afin d'évaluer la contribution de ce film hydrophobe dans la différence de comportement d'*E. necator*. L'analyse chimique a nécessité une étape de dérivation, préparation préalable des échantillons pour rendre possible la chromatographie en phase gazeuse. La dérivation des groupements fonctionnels polaires (principalement les atomes d'hydrogènes actifs) a été choisie en fonction des composés chimiques attendus, constitutifs des cires cuticulaires. L'emploi d'un solvant organique tel que le chloroforme permet d'extraire un mélange de cires cuticulaires, mais empêche toute séparation sélective des couches de cires épi- et intracuticulaires (Jetter *et al.*, 2000). Possingham *et al.* (1967) faisait déjà la distinction entre une fraction "dure" supprimable au chloroforme et une fraction "légère" éliminable aux vapeurs d'éther de pétrole, correspondant respectivement aux CI et CE. Cette double extraction chimique basée sur l'affinité de solvants avec les constituants des cires ne permet cependant pas d'obtenir une sélection qualitative stricte de la couche CE et CI, justifiant l'utilisation d'une autre méthode. La validation de la technique d'extraction à la gomme arabique afin de supprimer de manière sélective les CE (Jetter *et al.*, 2000; Jetter et Schäffer, 2001), a rendu possible l'analyse individuelle des CE et CI. L'emploi d'un adhésif exempt de solvant organique permet de retirer mécaniquement et de façon exhaustive les CE puis l'extraction chimique des CI restantes. Par cette technique, il est possible de déterminer quels composés présents en surface, participent à l'interaction hôte-pathogène. Si la nature des composés chimiques constitutifs restent identiques entre les deux couches de cires cuticulaires, leurs distributions diffèrent en fonction de leur localisation. Des différences de compositions des CE et CI ont été notées sur les feuilles de *Prunus laurocerasus* (Jetter *et al.*, 2000), *Nepenthes alata* (Riedel *et al.*, 2003), *Rosa canina* (Buschhaus *et al.*, 2007) et *Ligustrum vulgare* (Buschhaus *et al.*, 2007). Chez d'autres espèces végétales, la différence de composition chimique ne se situe pas entre les deux types de cires cuticulaires mais plutôt au niveau de la surface adaxiale ou abaxiale des feuilles étudiées (*Pisum sativum*, Gniwotta *et al.*, 2007; *Hordeum vulgare*, Zabka *et al.*, 2008). L'analyse chimique s'est focalisée sur la face supérieure des feuilles des deux espèces de *Vitis* car le développement d'*E. necator* est généralement observé et évalué sur la face adaxiale, qui de plus, ne présentent pas de stomates qui constitueraient une voie d'entrée pour les solvants organiques vers les tissus internes. Toutefois, l'analyse des cires de la face abaxiale des *Vitis* pourrait mettre à jour une différence de composition chimique, expliquant la présence préférentielle du pathogène sur la face supérieure des feuilles.

Après le traitement répété à la gomme arabique de la surface adaxiale des espèces de *Vitis* étudiées, le rendement en cires décroît drastiquement atteignant des valeurs très faibles après le troisième traitement. Cependant, l'extraction chimique suivante permet de libérer de grandes quantités de matériels. Ces résultats confirment la sélectivité du traitement adhésif pour extraire les cires situées le plus à l'extérieur de la cuticule (couche de CE). Le matériel cireux restant, libéré par l'extraction finale est interprété comme étant les cires liées au complexe de cutine (couche de CI). La dissolution de la fraction des cires internes n'est pas possible mécaniquement, du fait de leur imbrication dans le polymère de cutine. Les différents traitements (gomme arabique et extraction au chloroforme) ont été validés par des observations au MEB. L'action du traitement est nettement observable par la délimitation physique entre la surface témoin et la surface traitée. Le polymère de gomme supportant la couche de CE est difficilement distinguable de la feuille, dans le cas du Chasselas. Les cristaux provenant des cires de *V. candicans* étant scellés dans la gomme arabique, la topographie de surface n'est pas reproduite exactement à l'identique.

3.2 Composition des cires cuticulaires

Dans l'ensemble des classes chimiques, les séries d'homologues aliphatiques ont été identifiés avec des distributions typiques de composition de cires cuticulaires végétales. La distribution qualitative des différentes familles chimiques constitutives des cires cuticulaires établies par Radler (1965) sur *Vitis vinifera* variété Sultana est approximativement similaire à celle obtenue dans cette étude. L'acide oléanolique, composé majoritaire des cires cuticulaires des baies, est présent en plus faible quantité dans les cires foliaires de *Vitis vinifera* variété Sultana et pourrait constituer un triterpène spécifique à la variété étudiée. Les composés principaux des alcools primaires (C_{24} et C_{26}), des acides gras (C_{24} , C_{26} et C_{28}) et des alcanes (C_{27} , C_{29} et C_{31}) se trouve également être prédominants dans les résultats de Radler (1965) et suggèrent une uniformité dans la composition des cires cuticulaires au sein de l'espèce *Vitis vinifera*. La prédominance des alcools primaires, et notamment l'hexacosanol, apparaît également dans d'autres espèces végétales: le pois (*Pisum sativum* variété Avanta, Gniwotta *et al.*, 2005), la funkia (*Hosta* sp., Jenks *et al.*, 2002), le blé (*Triticum aestivum*, Bianchi *et al.*, 1979). Des variations quantitatives subsistent au sein des répliques, malgré le fait que les plantes aient été cultivées dans des conditions identiques. Les feuilles sélectionnées pour l'extraction provenaient de plantes de même stade physiologique mais l'exactitude de l'âge (en jours) des feuilles n'a pas été relevée. De manière générale, l'utilisation de plantes en serre sous-estime la quantité réelle de cires cuticulaires synthétisées en conditions de vignoble mais permet de s'affranchir des variations de profils cireux issus de l'orientation différente des feuilles à l'exposition du soleil (Jenks *et al.*, 2002).

Quant aux composés aliphatiques, leur distribution varie en fonction de l'âge des feuilles, à l'exemple de *Prunus laurocerasus*, même si la localisation des triterpènes au sein des CI restent inchangée durant le développement foliaire (Jetter *et al.*, 2000). Cette modification de la composition de surface pourrait expliquer la différence de sensibilité à l'oïdium observée entre jeunes et vieilles feuilles. La variation de la quantité et de la composition chimique des surfaces cireuses, en fonction de la saison, observée sur des génotypes d'*Hosta* peut être associée à la manifestation de la résistance à un stress biotique ou abiotique (Jenks *et al.*, 2002), signe d'une adaptation de la plante à son environnement proche. Pour la vigne, Radler (1965) a montré que la quantité de cires cuticulaires reste pratiquement constante au cours du développement végétatif chez *Vitis vinifera* var. Sultana, ce qui signifie qu'une potentielle résistance au pathogène serait plutôt de nature qualitative.

Cette étude permet pour la première fois de mettre en évidence la description précise de la composition des couches cireuses constitutives de la surface adaxiale des feuilles de deux espèces de *Vitis*. Certains composés se trouvent plus en surface comme les alcools primaires et les acides gras chez *V. candicans*, tandis que les triterpènes restent exclusivement dans la couche sous-jacente. Cette localisation spécifique est reportée dans bon nombre d'espèces végétales, telles que *Prunus laurocerasus* (Jetter *et al.*, 2000), *Rosa canina* (Buschhaus *et al.*, 2007), *Ligustrum vulgare* (Buschhaus *et al.*, 2007) même si les composés de cette famille chimique restent propres à l'espèce considérée. La localisation exclusive des triterpènes dans les CI pourrait être liée à leurs propriétés physico-chimiques, notamment l'encombrement et la polarité qui limiteraient leur accès vers les couches supérieures. Le germanicol, triterpène spécifique à *V. candicans*, se retrouve chez *Camellia* sp. et *Salvia officinalis*. Les composés d'une même famille chimique ayant une chaîne carbonée plus courte sont sans doute plus polaires et situés dans les CI, alors que leurs homologues à plus longues chaînes seraient liés aux CE (Wen *et al.*, 2006, Buschhaus *et al.*, 2007). Toutefois, les résultats ne montrent pas de gradient de taille moléculaire au sein des cires cuticulaires de *Vitis*.

3.3 Microstructure et propriétés physiques des surfaces étudiées

La première extraction mécanique à l'aide de la gomme arabique a permis de mettre en évidence la composition des CE de feuilles adaxiales de *V. candicans*, dominée par deux alcools primaires: l'hexacosanol (C_{26}) et l'octocosanol (C_{28}), accompagnés de quantités substantielles d'autres composés aliphatiques tels que les acides docosanoïque, tétracosanoïque et hexacosanoïque (C_{22} , C_{24} , C_{26}), l'hénétriacontane (C_{31}), le tétracosanol (C_{24}) et le triacontanol (C_{30}). Ces composés apparaissent donc constitutifs des cristaux de CE observables au MEB et confirment les résultats de Baker (1982) et de

Gniwotta *et al.* (2005) quant au rôle clé des alcools primaires dans l'élaboration de cristaux en "assiette". La classification des CE de Barthlott (1998) qui établit le lien entre la cristallographie et la composition chimique confirme la prédominance des alcools primaires dans la catégorie des cristaux en forme d'assiette, notamment observés chez les espèces d'*Eucalyptus* (Hallam et Chambers, 1970), *Lupinus albus* (Hargreaves *et al.*, 1982) et d'autres nombreuses espèces d'angiospermes (Jeffree, 1986). Les espèces de *Vitis vinifera* ont été classées au préalable par Jeffree (1986) dans les plantes présentant un type morphologique de cires foliaires sous forme de "film amorphe".

Le rôle des structures de surfaces sur le phénomène de pré-pénétration de pathogènes biotrophes a fait l'objet de plusieurs études (Lyngs Jørgensen *et al.*, 1995; Inyang *et al.*, 1999; Gniwotta *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2006; Zabka *et al.*, 2008). La co-cristallisation des composés majoritaires de CE contribue à la topographie de la surface foliaire liée à l'inhibition du développement fongique observée chez *V. candidans*. Un développement normal des structures infectieuses d'*Erysiphe graminis* est observé sur la face supérieure d'ivraie (*Lolium* sp.), tandis que les conidies déposées sur la face abaxiale génèrent de multiples tubes germinatifs courts (Carver *et al.*, 1990) à l'instar des appressoria multilobés observés sur *V. candidans*. De manière identique, la surface abaxiale de feuilles d'ivraie présentent des cristaux sous forme d'"assiette", pouvant inhiber le développement fongique.

Si les cires épi- et intracuticulaires jouent un rôle dans la régulation de la transpiration cuticulaire, la couche superficielle de cires est impliquée dans l'imperméabilité des couches cellulaires sous-jacentes. La mouillabilité d'une surface foliaire est étroitement corrélée à la composition chimique du film de CE et donc la microstructure cristalline de surface. Les composés apolaires (alcane) présentent un angle de contact aux gouttes d'eau plus élevé que des composés plus polaires et hydrophiles (alcools primaires, acides gras). Cette propriété a priori constitutive modifie l'hygrométrie de surface, modulant les conditions requises aux infections fongiques. La mesure de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur espèces sensibles et résistantes permettrait de corréler les phases de pré-pénétration fongiques aux caractéristiques topographiques de surface. Toutefois, la simple observation du comportement d'un film d'eau sur une feuille de l'espèce *V. candidans* dénote une propriété déperlante, qui restreint le degré d'hygrométrie de surface et réduit drastiquement la réalisation des premiers stades infectieux. Les phénomènes non topographiques telles que la polarité de surface ou la dureté du support peuvent également jouer un rôle sur l'affinité du pathogène envers son hôte (Gow, 1993). Par exemple, un matériel hydrophobe est nécessaire à la stimulation de la germination et de la formation d'appressorium chez *Magnaporthe grisea* (Hamer *et al.*, 1988; Hegde et Kolattukudy, 1997).

Le creuset géographique propre à *V. candidans* et à *E. necator* pourrait expliquer la cristallisation de surface observée. La co-évolution de ce système hôte-pathogène dans leur écosystème propre résulterait des différentes pressions environnementales rencontrées par la plante, les cires cuticulaires devenant ainsi un organe fonctionnel lié à la défense contre les infections fongiques (Jetter, 1986).

3.4 Composition des cires épicuticulaires et intracuticulaires, et interaction avec *E. necator*

Les CE constituent le premier point de contact entre le pathogène et son hôte. Les observations microscopiques démontrent que le développement fongique est conditionné par la configuration du film cireux. Sur les feuilles non-traitées, les deux critères observés (taux de germination, formation d'appressorium) sont deux fois plus faibles chez l'espèce résistante *V. candidans*. Cette réduction peut s'expliquer par la différence de motif de cristallisation observable au microscope électronique à balayage. La surface "lisse" du Chasselas semble fournir un stimulus actif à la conidie, nettement réduit dans le cas de *V. candidans*. L'altération des propriétés de surface modifie le comportement du champignon. La suppression des CE réduit significativement la formation d'appressorium dans le cas de l'espèce sensible, tandis que l'effet inverse s'observe chez l'espèce résistante. Ces résultats confirment que les CE jouent un rôle de stimulation du pathogène. Il semble que l'effet soit inversé au niveau des CI, sur lesquelles la formation d'appressoria est restreinte dans le cas du *V. vinifera* cv Chasselas mais significativement plus élevée chez *V. candidans*.

Les triterpènes sont connus pour leurs propriétés insecticides voire fongicides (Jetter *et al.*, 2000). La séquestration de tels composés dans les CI peut se traduire comme une défense constitutive contre les insectes piqueurs, masquée par les composants aliphatiques des CE, présents chez la majeure partie des végétaux (Jetter *et al.*, 2000). La similarité de structure entre la β -amyrine et les stérols permet d'imaginer que ces triterpénols disposent d'une activité toxique envers les insectes phytopathogènes (Eigenbrode *et al.*, 1991). Dans le cas présent, la β -amyrine présente uniquement chez le Chasselas, pourrait expliquer la réduction de germination et de formation d'appressorium après suppression des CE. Deux composés isoflavones antifongiques (lutéone et wightéone) sont associés aux cires cuticulaires des feuilles de *Lupinus albus*, mais ne présentent pas d'activité préventive à la formation du tube germinatif de *Cladosporium cucumerinum* (Hargreaves *et al.*, 1982). Ces molécules sont vraisemblablement présentes dans les CI et agissent lors de la pénétration du pathogène. La gomme arabique pure procure les conditions adéquates de germination d'*E. necator*, puisque le pourcentage de conidies germées est identique à celui obtenu sur le cépage sensible sans toutefois induire la formation d'appressoria. Le polymère de gomme

constitué à 50% d'eau fournit le degré d'hygrométrie nécessaire à l'émergence du tube germinatif. Cependant, l'absence de signal particulier semble inhiber toute différenciation en appressorium. Les CE semblent donc jouer un rôle primordial dans la formation des structures de pénétration. Comparativement, la germination des conidies de *M. grisea* est fréquente tandis que la formation d'appressorium est inférieure à 1% sur un support inerte (Hedge et Kolattukudy, 1997). La présence de CE scellées dans la gomme arabique induit une réponse spécifique, analogue à celle observée sur les feuilles témoin des deux espèces. Confirmant ces résultats, Gniwotta *et al.* (2005) indiquent que les caractéristiques des surfaces foliaires induisent un stimulus qui influence le processus de germination et la formation d'appressoria. Les faibles pourcentages de formation d'appressorium sur les CE fixées sur la gomme arabique après décapage peuvent s'expliquer par l'importante porosité du polymère. Il pourrait soit absorber les exsudats fongiques nécessaires à la différenciation en appressorium, soit les propriétés physiques de la gomme camouflent les effets des cristaux de CE (Gniwotta *et al.*, 2005).

3.5 Composés chimiques spécifiques liés au développement d'*E. necator*

Afin de déterminer si la différenciation en appressoria résulte d'un signal chimique provenant des cires de surface, les cires cuticulaires ont été fractionnées par chromatographie. Au vue des résultats, l'hypothèse selon laquelle l'espèce sensible posséderait une ou plusieurs fractions stimulatrices et l'espèce résistante disposerait d'une fraction inhibitrice de la formation d'appressoria a été envisagée. Si le pourcentage de germination apparaît identique à celui observé sur un support artificiel, le témoin constitué d'une lame gélosée montre un étonnant pourcentage de formation d'appressorium, qui reste toutefois inférieur à l'agar supportant les cires du cépage sensible. L'utilisation du chloroforme comme solvant ne perturbe pas les critères évalués. Les fractions chromatographiques non déterminées correspondent vraisemblablement à des lipides membranaires extraits lors du passage répété du solvant. Toutefois, en raison de leur poids moléculaire important, de la méthode de dérivation et des conditions de chromatographie, leur identification par chromatographie en phase gazeuse n'a pas pu être réalisée.

Les taux de germination et de formation d'appressoria observés sur les différentes fractions de cires cuticulaires de Chasselas n'atteignent jamais les valeurs des témoins. Si les alcools primaires semblent stimuler la germination quelque soit l'espèce, ils n'induisent pas la formation d'appressoria. Les alcanes et d'une façon générale les composés apolaires, inhibent plus fortement la germination des conidies déposées. Ce résultat a également été observé chez la fraction d'hydrocarbures des cires d'avocat, qui malgré sa forte présence dans la composition globale des cires, ne présente pas d'effet

sur la formation des appressoria de *Colletotrichum gloeosporioides* (Podila *et al.*, 1993). Ces mêmes auteurs ont observé que le maximum de stimulation sur la formation d'appressoria était obtenu par la fraction d'alcools primaires. La formation complète d'appressoria de *Magnaporthe grisea* a été observée sur les fractions d'hydrocarbures et d'alcools primaires, tandis que les acides gras montrent une toxicité liée à leur concentration. La présence d'un triterpénol spécifique à l'espèce (lupénol dans le cas du Chasselas, germanicol dans le cas de *V. candidans*) pourrait expliquer les faibles taux d'appressoria formés. La suppression mécanique des CE de Chasselas positionne la conidie en contact direct avec la couche de CI qui contient le 3- β -Lup-20(29)-en-3-ol acétate, composé potentiellement inhibiteur de la germination et de la formation de l'appressorium. A l'inverse, le germanicol présent chez *V. candidans* semble être responsable de l'augmentation des critères observés, le pourcentage de formation d'appressorium étant identique entre la fraction "alcools primaires et terpénol" et l'agar additionné de cires cuticulaires. Deux triterpènes pentacycliques (acide urosolique et oléanolique) constitutifs des cires de fruit d'avocat, sont inducteurs de la germination et de la formation d'appressoria de *C. gloeosporioides* (Kolattukudy, 1995). L'acide oléanolique, composé majoritaire des cires cuticulaires de baie de *V. vinifera* cv Sultana (Possingham, 1967) n'interfère pas sur le développement d'*E. necator* sur cet organe. De nombreuses études ont identifié une famille chimique voire un composé particulier à l'origine de la différenciation des structures infectieuses. L'octacosanal, présent dans les CE des feuilles de *Triticum compactum* induit la différenciation des structures infectieuses de l'agent de la rouille *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Reisige *et al.*, 2006). La fraction aldéhydique des cires cuticulaires d'*Hordeum vulgare* présente une induction de la différenciation en appressoria chez *Blumeria graminis* (Tsuba *et al.*, 2002). L'hexacosanal est le constituant majoritaire de cette fraction d'aldéhydes chez l'orge mais également chez le tabac, plante non-hôte. La différence de formation d'appressorium entre les deux espèces peut faire penser que les autres constituants des cires peuvent masquer l'activité d'induction chez le tabac, indiquant la nécessité de considérer les cires cuticulaires dans leur globalité chimique.

D'une manière générale, aucune fraction chromatographique ne dispose d'une activité stimulatrice de la formation d'appressoria d'*E. necator*, confirmé par la similarité de composition chimique entre les deux espèces étudiées. Les quantités de composés des différentes fractions, supérieures dans les cires cuticulaires de *V. candidans*, semblent accroître la germination des conidies, sans toutefois augmenter la différenciation en appressorium. Il serait nécessaire de tester les composés majoritaires purs afin d'estimer leur véritable capacité à induire la formation d'appressorium chez *E. necator*. Les résultats orientent le processus de reconnaissance de l'hôte vers un stimulus du complexe de cires cuticulaires dans leur globalité. Même si les alcools primaires et les

triterpénols constituent globalement les deux tiers des cires cuticulaires des deux espèces, la structure cristalline reflète l'enchevêtrement de l'ensemble des composés constitutifs. La topographie spécifique résultante conditionne le comportement du pathogène lors du premier contact à la surface de l'hôte. L'adéquation entre les CE de l'hôte et la particule fongique peut toutefois résulter d'un équilibre favorable entre fractions inductrices et antagonistes de la différenciation en appressorium. La germination et la formation d'appressoria ne sont pas toujours spécifiques à la plante hôte, mais peuvent également se réaliser de façon moindre sur des espèces non-hôte (Tsuba *et al.*, 2002), suggérant l'implication d'un facteur physique et/ou chimique commun à plusieurs espèces végétales.

Cette notion de spécificité hôte-pathogène a été mise en évidence par les travaux de Podila *et al.* (1993). Les cires cuticulaires non hôte sont incapables de stimuler le développement de *C. gloeosporioides* en l'absence d'un signal chimique et/ou la présence d'un inhibiteur de la formation de l'appressorium. Inversement, l'induction de la formation d'appressorium d'autres espèces de *Colletotrichum* n'est pas observable sur les cires cuticulaires de la plante hôte, qui restent spécifiques pour un pathogène donné.

Le dépôt de fractions cireuses après évaporation du solvant organique employé pour l'extraction des cires cuticulaires peut provoquer une distribution hétérogène avec des régions plus riches en composés que d'autres. Le recouvrement d'une surface hydrophyle basé sur la procédure de Langmuir-Schäfer (Reisige *et al.*, 2006), permettrait le dépôt homogène d'une couche monomoléculaire d'une substance donnée et d'évaluer de façon plus fiable la bioactivité de composés lipophiles sur les premiers stades infectieux .

3.6 Conclusion

La différence de composition chimique observée entre *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candidans* s'exprime plus dans la microstructure cristalline de surface plutôt que sur la caractérisation d'une famille chimique spécifique, disposant d'une activité stimulatrice et/ou inhibitrice de la germination et de la formation d'appressoria d'*E. necator*. La disposition des cristaux de CE de *V. candidans* en forme d'assiette inhibe les premières séquences de développement du pathogène. Toutefois, la combinaison de plusieurs facteurs physiques et chimiques à la surface de la plante hôte peut être requise pour assurer la différenciation des structures infectieuses (Tsuba *et al.*, 2002). De plus, chaque étape séquentielle de l'infection peut nécessiter des signaux différents, spécifiques à chaque pathogène (Hedge et Kolattukudy, 1997). Le rôle de la topologie de surface dans le comportement d'*E. necator* pourrait être confirmé par l'emploi de membrane artificielle simulant la surface de l'hôte. Enfin, l'étude approfondie des caractéristiques microphysiques (comportement calorimétrique par Differential Scanning Calorimetry, analyse de la diffraction aux rayons X, Atomic Force Microscopy),

permettraient de déterminer l'arrangement moléculaire des composés aliphatiques dans la structure des cires cuticulaires (Casado et Heredia, 1999; Koch *et al.*, 2004).

L'identification d'un seul composé actif dans la différenciation en appressorium reste hypothétique, même si le principe a été démontré dans quelques pathosystèmes. Il semble toutefois plus vraisemblable d'appréhender les CE comme un élément global de reconnaissance de l'hôte, dont les propriétés physico-chimiques ont la capacité de stimuler ou d'inhiber le processus infectieux.

Chapitre III: Contribution du polymère de cutine dans la résistance à *Erysiphe necator*

1 Introduction

Sous la couche des cires épicuticulaires, la cuticule des plantes est constituée d'un polymère lipidique de cutine, réseau relativement rigide d'acides gras hydroxylés inter-estérifiés, scellé dans une couche de matériel cireux (cires intracuticulaires). La composition chimique de la cutine détermine les propriétés physico-chimiques de la cuticule, et joue par conséquent un rôle clé dans l'interaction de la plante avec son environnement (Walton et Kolattukudy, 1972). La dépolymérisation enzymatique de la cutine offre une voie d'entrée dans la cellule hôte pour les pathogènes fongiques libérant des enzymes à activité cutinolytique lors des premières étapes de l'infection (Baker et Bateman, 1978). La différenciation des structures infectieuses sur la cuticule est associée à la sécrétion d'estérases (Wang *et al.*, 2006).

Durant le processus de germination, les conidies d'*Erysiphe graminis* libèrent des exsudats contenant des estérases (Nicholson *et al.*, 1988), des cutinases et un bagage d'enzymes hydrolytiques extracellulaires en réponse à un stimulus de contact, aboutissant à l'hydrolyse de la cutine et la libération de monomères de cutine (Frič et Wolf, 1994; Kolattukudy *et al.*, 1995). Ces composés ont la capacité d'engendrer une série d'évènements liés à l'induction de réactions de défense. Schweizer *et al.* (1996a) ont démontré leur implication dans l'alcalinisation du milieu environnant, la phosphorylation de protéines, la production d'éthylène ainsi que la transcription de gènes liés à la pathogénèse dans les cellules de pomme de terre. Les monomères de cutine de différentes espèces végétales montrent également la capacité d'induire la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) au sein des hypocotyles de concombre (Fauth *et al.*, 1998). Certains monomères de cutine stimulent la germination et la formation d'appressorium chez *Magnaporthe grisea* (Gilbert *et al.*, 1996). Cependant, la présence de monomères de cutine dans l'environnement proche du site d'infection peut servir de signal d'induction des défenses de l'hôte (Fauth *et al.*, 1998). En outre, l'application de certains monomères spécifiques confère une protection aux feuilles de cultivars sensibles d'orge à *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (Schweizer *et al.*, 1996b). Les monomères de cutine testés n'exhibant pas d'effet fongitoxique, l'auteur suggère que la protection observée résulte de l'acquisition de résistance chez la plante et que certains monomères constituent un éliciteur endogène de réactions de défense.

L'expression d'un gène de levure (Δ -9 désaturase) dans les tomates modifie le profil des monomères de cutine libérés après dégradation due aux enzymes fongiques et engendre une réduction de la pathogénicité d'*Erysiphe polygoni* (Wang *et al.*, 2000). Ces monomères, et plus particulièrement l'acide 9-hexadécénoïque présent en plus grande quantité dans la cutine de plantes transgéniques, agissent directement sur les structures fongiques en inhibant la germination des conidies. Des acides obtenus par hydrolyse chimique de cutine foliaire de citron sont toxiques pour *Gloeosporium limetticola* (Martin, 1964), en partie dû à la présence de groupements "époxy-". Selon Eibert *et al.* (1999), la formation d'appressoria chez *M. grisea* est inhibée par des acides gras monoinsaturés de longueur de chaîne allant de 16 à 20 atomes de carbone, que ce soit sur des surfaces inductives (hydrophobes) ou non-inductives (hydrophiles).

Heintz and Blaich (1990) suggèrent que la pénétration est principalement la conséquence d'une force mécanique. Toutefois, de nombreuses espèces d'oïdium sont capables de synthétiser et de sécréter des enzymes de dégradation de la cuticule et de la paroi cellulaire de la plante hôte (Pascholati *et al.*, 1992; Frič et Wolf, 1994). Les enzymes à activité estérase et cutinase contribuent à l'adhérence des spores fongiques à la surface de l'hôte, observée notamment chez les uredospores d'*Uromyces vicia-fabae*, agent de la rouille du haricot (Deising *et al.*, 1992).

Les monomères de cutine, libérés lors de la dégradation enzymatique, peuvent jouer un rôle direct dans l'interaction hôte-pathogène. Certains possèdent une activité fongitoxique sur le développement des structures infectieuses qui, dans un second temps, peuvent induire les voies de biosynthèses de réactions de défense de la plante.

Les objectifs de cette étude consistent à mettre en évidence la présence d'une estérase-cutinase constitutive des conidies d'*E. necator* et d'identifier les monomères de cutine libérés après hydrolyse chimique et enzymatique chez deux espèces de *Vitis*, de sensibilité différente à l'oïdium.

2 Résultats

Les protéines pariétales et cytoplasmiques des conidies non germées d'*E. necator* ont été extraites séparément. Les activités estérase ont été dosées par spectrophotométrie en mesurant l'apparition de nitrophénol à 405 nm par dégradation du para-nitrophénylbutyrate. Une activité estérase est dosée de manière constitutive dans la fraction pariétale des conidies non germées d'*E. necator*, tandis qu'aucune activité n'est détectée dans l'extrait cytoplasmique (Tableau 6).

Tableau 6 Activité estérase dans les extraits protéiques cytoplasmiques et pariétaux des conidies non germées d'*E. necator*.

Extrait	Protéines	Activité
	[$\mu\text{g mg}^{-1}$ conidie]	[$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéine]
Cytoplasmique	112.7 ($\pm$ 2.6)	0
Pariétal	54 ($\pm$ 4.0)	0.26 ($\pm$ 0.08)

L'activité cutinase a été mesurée au moyen de (^3H)-cutine, en tant que substrat d'hydrolyse (Tableau 7). L'activité enzymatique de l'extrait protéique pariétal libère trois fois plus de monomères d'acides gras marqués que celle mesurée dans le témoin, indiquant qu'une cutinase active est présente au sein des conidies non germées d'*E. necator*.

Tableau 7 Radioactivité libérée par l'activité cutinase de l'extrait pariétal des conidies non germées d'*E. necator*.

Extrait	Activité (cpm $\times 10^6$)
Témoin	3.126 ($\pm$ 0.003)
Dépolymérisation enzymatique	9.902 ($\pm$ 0.014)

La localisation histochimique de l'activité cutinase a été observée après inoculation de conidies d'*E. necator* sur un substrat gélosé contenant de l'indoxyl acétate en tant que substrat, formant des cristaux d'indigo aux sites d'hydrolyse. Les conidies témoin, autoclavées, restent hyalines après contact avec le substrat (Figure 23A). La formation de cristaux apparaît à la surface de la conidie et non dans le cytoplasme (Figure 23B). L'activité cutinase pariétale diffuse au niveau du tube germinatif et se concentre à son apex (Figure 23C).

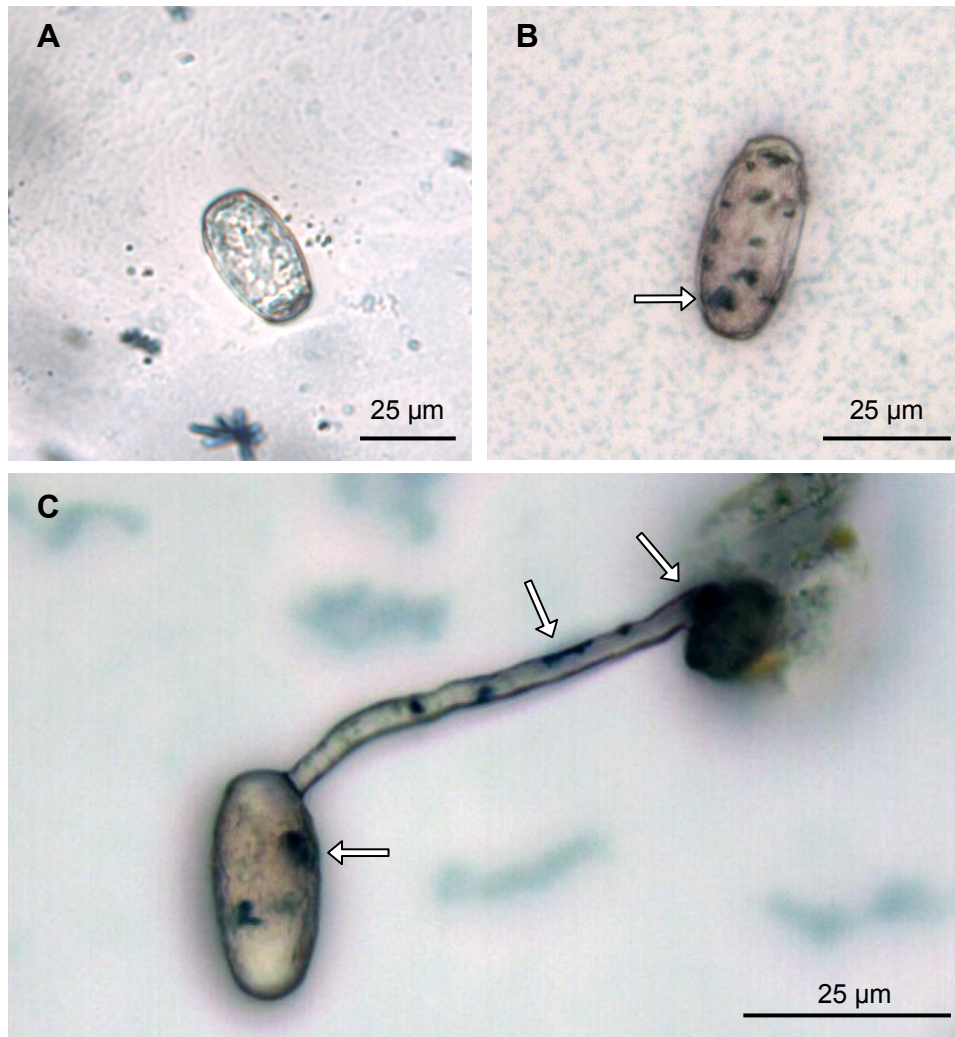


Figure 23 Localisation histochimique de l'activité cutinase dans les conidies d'*E. necator* visualisée par la formation de cristaux indigo aux sites d'hydrolyse (flèches). A. Conidie témoin inactivée par autoclavage; B. Conidie non germée; C. Conidie avec tube germinatif.

Suite au processus de germination de la conidie, l'apex du tube germinatif résultant exerce une pression mécanique sur la surface cuticulaire aboutissant à une légère dépression facilement observable (Figure 24A,B). La zone de contact entre l'appressorium et la surface de l'hôte présente une altération de la surface cuticulaire. L'aspect mucilagineux observable semble être le résultat de la dégradation enzymatique de la cuticule (Figure 24C,D). La surface cuticulaire en marge de l'appressorium reste intacte.

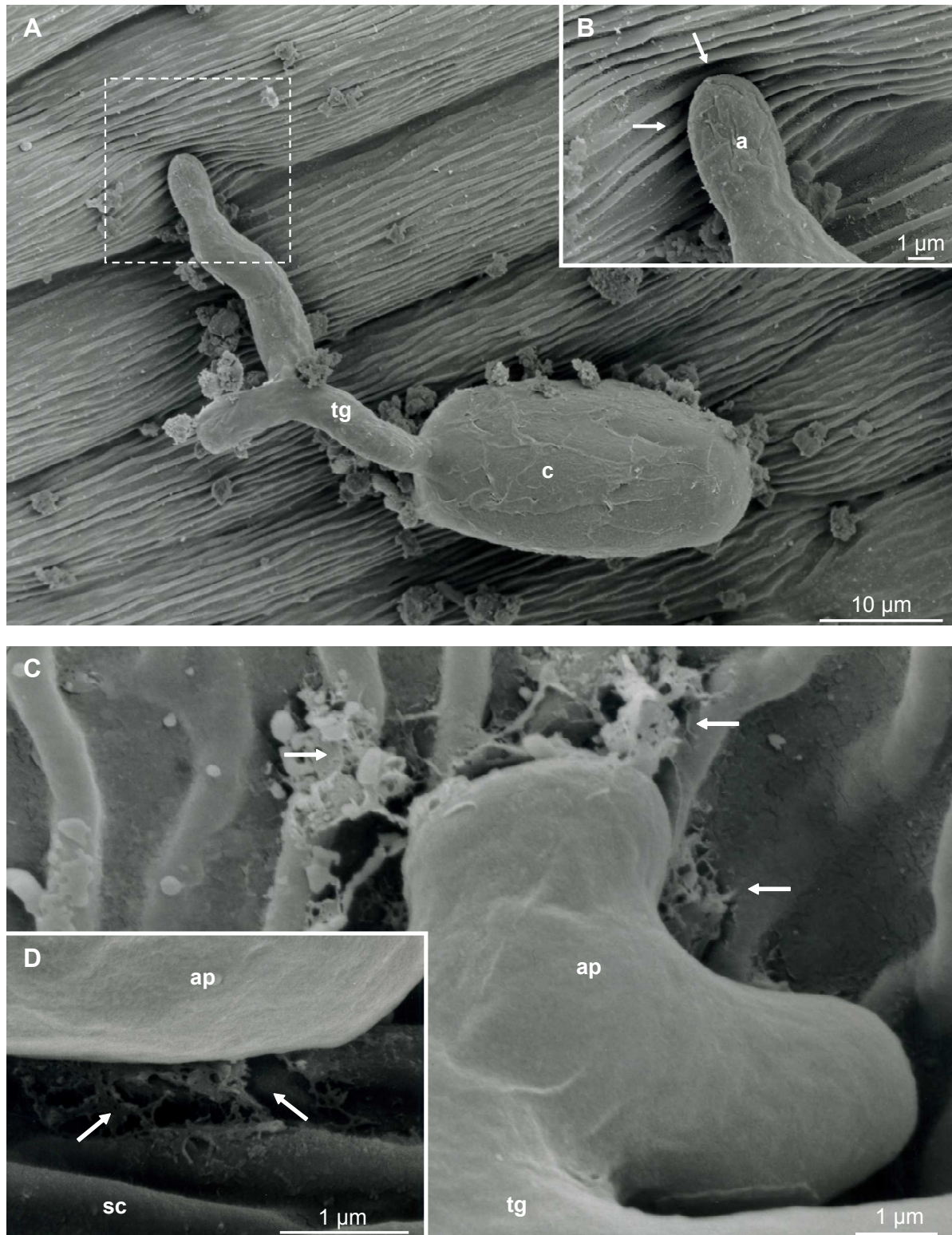
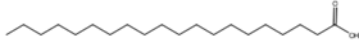
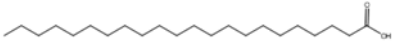
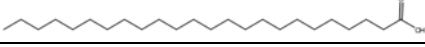
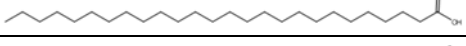
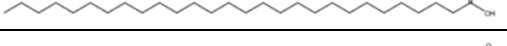
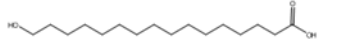
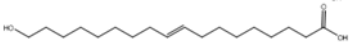
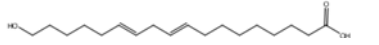
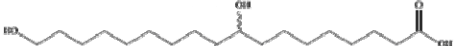
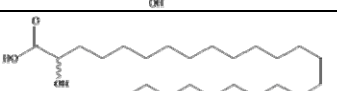
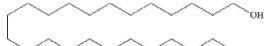
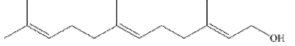


Figure 24 Observations au microscope électronique à balayage des premiers stades infectieux d'*E. necator* sur *Vitis vinifera* cv. Chasselas. A. Déformation de la surface cuticulaire par pression du tube germinatif. B. Détail de A, les flèches indiquent les zones de pression exercée par l'apex du tube germinatif. C. Dégradation de la surface cuticulaire (flèches) en périphérie de la zone de contact entre l'appressorium et la surface. D. Détail de C, dégradation cuticulaire de la surface sous-jacente à l'appressorium. a: apex du tube germinatif, ap: appressorium, c: conidie, sc: surface cuticulaire, tg: tube germinatif.

L'hydrolyse chimique de la cutine de *Vitis vinifera* cv Chasselas et de *Vitis candidans* a permis d'identifier des composés aliphatiques constitutifs, sans toutefois pouvoir les quantifier précisément du fait de la faible quantité de matériel recueilli. Les composés des fractions saponifiables et insaponifiables ont été réunis dans le tableau 8. Les alcanes sont présents dans une fourchette allant de 24 à 33 atomes de carbones. Les alcanes les plus courts (C_{24} à C_{26}) sont absents chez *V. candidans*. La présence de groupement hydroxyle sur les chaînes d'acides gras et le degré de saturation caractérisent les différences de composition chimique entre les deux espèces de *Vitis*. Trois acides gras ont été identifiés chez le Chasselas, dont les acides en C_{18} à deux et trois doubles liaisons lui sont spécifiques. *V. candidans* présente une large gamme d'acides gras saturés, de 16 à 30 atomes de carbone. Cette même espèce dispose également d'acides gras ayant un à trois groupements hydroxylés répartis sur la chaîne carbonée. Quelques alcools primaires ont également été identifiés, spécifiques à l'une ou l'autre espèce. Aucun groupement "époxy" n'a été mis en évidence sur les acides gras.

Tableau 8 Monomères de cutine constitutifs des espèces *V. vinifera* cv Chasselas et *V. candidans*.

Composés	Formule chimique	Structure chimique	<i>V. vinifera</i> cv Chasselas	<i>V. candidans</i>
Alcanes				
tétracosane	$C_{24}H_{50}$		✓	
pentacosane	$C_{25}H_{52}$		✓	
hexacosane	$C_{26}H_{54}$		✓	
heptacosane	$C_{27}H_{56}$		✓	✓
octacosane	$C_{28}H_{58}$		✓	✓
nonacosane	$C_{29}H_{60}$		✓	✓
triacontane	$C_{30}H_{62}$		✓	✓
hénétriacontane	$C_{31}H_{64}$		✓	✓
dotriacontane	$C_{32}H_{66}$		✓	✓
tritriacontane	$C_{33}H_{68}$		✓	✓
Acides gras saturés et insaturés				
hexadécanoïque	$C_{16}H_{32}O_2$		✓	✓
octadécanoïque	$C_{18}H_{36}O_2$			✓
9-octadécanoïque	$C_{18}H_{34}O_2$			✓
9,12-octadécanoïque	$C_{18}H_{32}O_2$		✓	
linoléinique	$C_{18}H_{30}O_2$		✓	

eicosanoïque	C ₂₀ H ₄₀ O ₂		✓	
docosanoïque	C ₂₂ H ₄₄ O ₂		✓	
tétrasanoïque	C ₂₄ H ₃₈ O ₂		✓	
hexasanoïque	C ₂₆ H ₅₂ O ₂		✓	
octosanoïque	C ₂₈ H ₅₆ O ₂		✓	
triacontanoïque	C ₃₀ H ₆₀ O ₂		✓	
Acides gras hydroxylés				
16-hydroxy-hexadécanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₃		✓	
10,16-dihydroxy-hexadécanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₄		✓	
18-hydroxy-9-octadécanoïque	C ₁₈ H ₃₄ O ₃		✓	
18-hydroxy-9,12-octadécadiénoïque	C ₁₈ H ₃₂ O ₃		✓	
9,10-dihydroxy-octadécanoïque	C ₁₈ H ₃₆ O ₄		✓	
9,10,18-trihydroxy-octadécanoïque	C ₁₈ H ₃₆ O ₅		✓	
2-hydroxy-tétracosanoïque	C ₂₄ H ₄₈ O ₃		✓	
Alcools primaires				
octadéc-9-énol	C ₁₈ H ₃₆ O		✓	✓
tétracosanol	C ₂₄ H ₅₀ O		✓	
hexacosanol	C ₂₆ H ₅₄ O		✓	✓
farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O		✓	

Le faible rendement de l'hydrolyse enzymatique de cutine n'a pas permis de caractériser les monomères libérés. Les acides 9,12-octadécadiénoïque et linoléique ont bien été retrouvés dans l'hydrolyse de la cutine de Chasselas, présents avec des alcanes à longue chaîne. Chez *V. candicans*, aucun monomère d'acides gras n'a pu être identifié. Étonnamment, un grand nombre d'hydrates de carbone ont été retrouvés lors de l'accroissement de la durée de sonication du polymère et l'emploi de n-dodécylglucoside pour améliorer la solubilité du substrat. Le gulose est présent en quantité importante chez *V. candicans* (16.2 µg) et chez *V. vinifera* cv Chasselas (4.7 µg).

3 Discussion

3.1 Activité enzymatique d'*E. necator*

Le processus d'infection de pathogènes fongiques respecte une séquence chronologique d'infection au cours de laquelle, chaque stade morphologique joue un rôle fonctionnel précis dans la colonisation de l'hôte. Après contact avec la surface foliaire, la conidie d'*E. necator* élabore rapidement un tube germinatif dont l'apex se rapproche de la surface hôte pour y exercer une pression mécanique. Le processus de reconnaissance de l'hôte et donc la différenciation en structure infectieuse spécialisée doit vraisemblablement s'effectuer lors de ce contact précoce. Le signal généré par les caractéristiques topographiques et/ou chimiques de la surface hôte engendre la formation de l'appressorium, autour duquel la cuticule est dégradée par des cutinases. Au vu des résultats obtenus, la pénétration et l'infection proprement dite des tissus de l'hôte résultent d'une action combinée entre pression mécanique et digestion enzymatique.

Les mucilages présents à l'interface hôte-pathogène peuvent contenir des estérases non spécifiques et dans quelques cas des cutinases (Deising *et al.*, 1992 ; Pascholati *et al.*, 1993). La présence de cutinase a été mise en évidence dans les exsudats d'*E. graminis* (Pascholati *et al.*, 1992). La matrice extracellulaire présente en périphérie des structures infectieuses, a été observée sous les appressoria d'*E. necator*, développés sur des substrats artificiels, ceci confirmant l'origine fongique de cette matrice (Rumbholz *et al.*, 2000). Cependant, l'altération de la cuticule observée au MEB implique que la dissolution enzymatique du complexe "cutine et cires cuticulaires" participe également à la composition de ce matériel extracellulaire et vraisemblablement à l'amélioration de l'adhérence. L'utilisation d'inhibiteurs des activités estérases et cutinases n'affecte pas l'adhérence des conidies sur la cuticule (Rumbholz *et al.*, 2000), suggérant la sécrétion d'autres molécules ayant un rôle d'adhésifs tels que des polysaccharides, des protéines et glycoprotéines (Jones, 1994). Le film impliqué dans l'adhérence des conidies de *B. cinerea* à des substrats hydrophiles ou hydrophobes contient du glucose (30%), une galactosamine (3%) et des protéines (30 à 44%) (Doss *et al.*, 1995). Rumbholz *et al.* (2000) ont mis en évidence une forte corrélation entre la formation d'appressoria d'*E. necator* et une augmentation de l'adhérence, suggérant que l'attachement des spores fongiques aux surfaces hôtes est étroitement lié au développement des structures infectieuses. La zone de contact entre l'appressorium et la cutine constitue un point d'ancrage effectif pour le maintien du pathogène sur l'hôte. Ceci est confirmé par le fait qu'après lessivage, les conidies se rompent au niveau du tube germinatif, laissant l'appressorium fermement attaché.

Les conidies d'*E. necator* possèdent donc une activité cutinase pariétale constitutive, mise en évidence par l'hydrolyse de cutine marquée. Une activité cutinase est exprimée lors de la germination et durant le développement mycélien de *B. cinerea* quelque soit le milieu de culture employé (Salinas *et al.*, 1986; Gindro et Pezet, 1997). Cette enzyme est rapidement synthétisée puisqu'elle est mesurable deux heures après inoculation (Gindro K., communication personnelle). Frič et Wolf (1994) décrivent une importante activité estérase chez les conidies germées et non-germées d'*E. graminis*. L'activité lipolytique est supérieure chez les conidies non germées du fait de l'implication des lipases dans la mobilisation des lipides de stockage de la conidie ou dans l'hydrolyse des lipides liés à la paroi cellulaire durant la germination et la croissance des structures infectieuses.

Le pathogène pourrait disposer d'un mécanisme efficace de reconnaissance de contact avec la plante hôte, notamment par les monomères de cutine rapidement libérés par la cutinase pariétale constitutive. Ils activeraient les gènes impliqués dans le processus infectieux (Kolattukudy *et al.*, 1989) et notamment la différenciation en appressorium. L'absence de formation d'appressorium sur support inerte (Chapitre I et II) pourrait être due à l'absence de tels signaux biologiques et par conséquent la non-activation de gènes liés à la pathogénèse.

La synthèse d'enzymes cutinolytiques et leur excrétion chez *Fusarium solani* sont induites par une faible quantité d'hydrolysats de cutine (Kolattukudy *et al.*, 1995). Un phénomène identique est observé sur la cuticule de feuille de pommier après contact avec des conidies de *Venturia inaequalis* (Köller *et al.*, 1991). Différentes isoenzymes d'estérases ont été mises en évidence dans les conidies de *Curvularia eragrostidis*, dont la libération est affectée par certaines cires épicuticulaires des plantes hôte employées comme substrat (Wang *et al.*, 2006). Ceci a pour conséquence de modifier la virulence d'un même pathogène. La disposition d'enzymes hydrolytiques représente un avantage pour le pathogène fongique, lui permettant une détérioration structurale rapide du complexe de cutine, et en participant également au processus de reconnaissance de l'hôte.

Les exsudats libérés par les conidies d'*E. graminis* contiennent une activité estérase, qui altère partiellement les cires épicuticulaires (partie non cristalline) de feuille d'orge (Kunoh *et al.*, 1990). *V. vinifera* cv Chasselas présente un motif amorphe des cires de surface et l'érosion cuticulaire résultant de l'activité estérase pourrait possiblement engendrer une surface propice à l'initiation du processus infectieux (Kunoh *et al.*, 1990). Toutefois, l'importance de la participation d'une enzyme capable de dégrader les composés cireux de la cuticule reste inconnue. La présence d'une estérase non spécifique dans les conidies d'*E. necator* pourrait être limitée à l'hydrolyse des esters de cires cuticulaires, pouvant également activer les gènes spécifiques de cutinase. Skamnioti et Gurr (2007) ont identifié une cutinase CUT2 chez *M. grisea*, dont l'expression est

surexprimée durant la maturation de l'appressorium et la pénétration de l'hôte par l'hyphe. La non-expression de cette même enzyme chez le mutant *cut2* restreint drastiquement la virulence sur le riz (*Oryza sativa*) et le blé (*Hordeum vulgare*).

La localisation de l'activité estérase à la surface des conidies ainsi que sur les structures infectieuses en développement confirme les observations de Rumbholz *et al.* (2000) sur *E. necator*, mais également sur d'autres oïdiums tels que *E. graminis* (Nicholson *et al.*, 1988) ou *Uromyces vicia-fabae* (Deising *et al.*, 1992). Cette estérase constitutive des conidies d'*E. necator* serait sécrétée lors de l'arrivée de la spore sur la surface foliaire, durant les phases précoces de l'infection (Köller *et al.*, 1991). La surface réticulée des conidies turgescentes observée au MEB accroît la surface de contact avec l'hôte. De même, la perception de signaux liés à l'établissement de l'infection induit une plus grande quantité de matériel lié à la pathogénèse. Carver *et al.* (1999) estime qu'une faible quantité de matériel extracellulaire peut-être libérée au sommet des granulations ponctuant la surface des conidies de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, lors du contact avec la surface de l'hôte. Ces mêmes auteurs proposent que la reconnaissance du site de contact pourrait participer à l'orientation de l'émergence du tube germinatif, afin de maximiser son contact avec la surface cuticulaire. La faible quantité de monomères de cutine libérés par la cutinase pariétale agirait comme un stimulateur du développement du tube germinatif et induirait la synthèse de cutinase en quantité nécessaire pour assurer la déstructuration de la cutine et la pénétration aux sites de formation de l'appressorium. Les cristaux d'indigo observables au niveau de la paroi du tube germinatif et de son apex indiquent une production croissante de cutinase, induite par les monomères de cutine nouvellement hydrolysés. La formation de l'appressorium peut constituer le point crucial de l'induction des estérases à activité cutinolytique, dont l'accumulation ponctuelle localisée permet une digestion rapide du complexe de cutine.

Une polémique partageait les auteurs quant à la contribution individuelle des mécanismes physiques ou enzymatiques impliqués dans la pénétration de l'hôte. Les avancées techniques permettent d'analyser plus précisément le bagage enzymatique mis en jeu lors de l'interaction hôte-pathogène. Les mécanismes de pénétration de l'hôte par les structures infectieuses demeurent partiellement compris même si les enzymes cutinolytiques ont été identifiées et caractérisées chez un grand nombre de pathogènes fongiques (Kolattukudy, 1985). Il est toutefois concevable que dans la majeure partie des champignons phytopathogènes, la combinaison d'une force mécanique associée à la capacité de synthétiser des enzymes extracellulaires (estérases et plus particulièrement cutinases) de dégradation de la cutine, permettent le processus de pénétration.

3.2 Composition chimique de la cutine de *Vitis*

Pour caractériser les constituants de la cutine, une hydrolyse alcaline est généralement employée malgré un taux de préservation de plus de 40% de la cutine, dû à la présence de liaisons plus stables (éther, peroxyde) (Walton et Kolattukudy, 1972). Il est possible que la cutine des espèces de *Vitis* étudiées présente une forte proportion de cutane, polymère polyméthylque hautement réfractaire à l'hydrolyse chimique (Jeffree, 1996; Villena *et al.*, 1999), expliquant les faibles quantités de matériel recueillies. Les monomères de cutine identifiés chez les deux espèces de *Vitis* étudiées sont proches des compositions des cuticules végétales recensées dans la littérature, à savoir la présence d'acides gras en C₁₆ et/ou C₁₈.

Les acides di-hydroxyhexadécanoïques sont les constituants majeurs de la cutine de cirse (*Cirsium Horridulum*, Marga *et al.*, 2001), mais des sucres, phénols et triterpènes ont également été identifiés en marge des lipides. *V. candicans* montre une étonnante aptitude à générer des acides gras saturés à longue chaîne (de C₂₀ à C₃₀), phénomène non décrit jusqu'à présent dans la composition du polymère de cutine. Cependant, une meilleure extraction des monomères de cutine par l'amélioration de la procédure d'hydrolyse chimique permettrait de quantifier et d'estimer la pertinence de tels composés dans la matrice de cutine.

Kolattukudy *et al.* (1981) ont montré que les enzymes fongiques de dégradation de la cutine présentaient un haut degré d'affinité pour les esters d'acides gras à courte chaîne. La reconstitution de l'hydrolyse enzymatique de la cutine des deux espèces de *Vitis* a été entreprise avec la cutinase de *B. cinerea*, champignon plus facile à cultiver en quantité importante pour disposer d'un extrait enzymatique suffisamment actif. Si l'activité estérase de l'extrait protéique de *B. cinerea* a été validée sur para-nitrophénylbutyrate, les conditions d'hydrolyse de la cutine n'ont pas pu être déterminées. Le pH permettant une activité optimale de l'enzyme est spécifique à l'espèce fongique utilisée. La cutinase de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* nécessite un tampon alcalin (pH 10) (Purdy et Kolattukudy, 1975) tandis que celle de *B. cinerea* est active dans des conditions acides (Baker et Bateman, 1978). Toutefois le pH neutre utilisé lors de l'expérimentation ne doit pas inhiber l'activité enzymatique et tout au plus réduire la quantité de monomères libérés. L'alcalinisation du milieu environnant le site d'hydrolyse chimique suite à la libération de certains monomères pourrait être responsable de la modification de fonctionnement de l'enzyme et donc réduire l'activité cutinolytique.

La purification du substrat de cutine est tout aussi importante que les conditions de réactions enzymatiques. La poudre de cutine a montré des problèmes de solubilisation dans une solution aqueuse d'extrait enzymatique. Des essais de pré-solubilisation dans du butan-1-ol, de sonication durant des périodes plus ou moins prolongées à 25 et/ou 50 KHz, de chauffage couplé à la sonication, n'ont pas permis d'accroître l'efficacité de la

réaction. La cuticule végétale a tendance à absorber des quantités importantes de matériel lipophiles lors de la digestion enzymatique par des pectinases et cellulases de la procédure de purification du complexe de cutine (Schönherr et Riederer, 1986). Ce matériel lipidique excédentaire (acides gras, phospholipides membranaires) provenant vraisemblablement du contact prolongé entre les tissus en dégradation et la cutine, constitue une entrave à l'accès de l'enzyme au substrat et pourrait expliquer les faibles rendements obtenus dans l'expérimentation (Baker et Bateman, 1978).

La série d'hydrates de carbones identifiés dans ces conditions particulières de réaction peut également être prétexté puisque le glucose constitue un répresseur de la cutinase (Salinas, 1986). Il est tout à fait envisageable, que la cutine de *Vitis* contienne une quantité importante d'hydrates de carbone, qui constituent 62 à 70% de la cutine de la feuille de *Cirsium horridulum*, inhibant par leur présence la cutinase fongique. Toutefois de tels composés n'ont pas été identifiés lors de l'hydrolyse chimique.

L'activité cutinase, identifiée au niveau de la paroi des conidies d'*E. necator*, doit vraisemblablement permettre d'hydrolyser une faible quantité de cutine lors du contact entre la spore et la surface de l'hôte. Kolattukudy (1985) a montré que ces monomères ainsi libérés en faible quantité induisaient la transcription du gène de cutinase au sein des spores de *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, dont les acides 10,16-dihydroxyhexadécanoïque et 9,10,18-trihydroxyoctadécanoïque constituent les signaux les plus efficaces (Woloshuk et Kolattukudy, 1986; Ahmed *et al.*, 2003). Des monomères de cutine, particulièrement l'acide *cis*-9,10-époxy-18-hydroxyoctadécanoïque et le *cis*-9-octadécen-1-ol, induisent la formation d'appressorium chez *M. grisea* dans l'ordre du nanomolaire (Gilbert *et al.*, 1996). A l'inverse, ce même acide 10,16-dihydroxyhexadécanoïque est également le monomère majoritaire présent dans la cutine foliaire de poire et ses quantités sont significativement supérieures chez le génotype résistant au Psylle (*Cacopsylla pyricola*); cela malgré une épaisseur de cutine plus faible comparativement aux génotypes sensibles (Gérard *et al.*, 1993). Chaque monomère de cutine semble donc posséder une activité propre, permettant d'induire ou d'inhiber le développement fongique, lié au pathosystème étudié.

La formation d'appressorium de *M. grisea* a été observée sur différents hôtes, suggérant que l'initiation de la formation de cette structure infectieuse n'est pas spécifique à l'hôte. Toutefois, l'hydrophobicité de surface reste un critère *sine qua non* aux événements de pré-pénétration du pathogène (Gilbert *et al.*, 1996). Les groupes hydroxyles libres déterminent l'hydrophilie de la surface et facilite ainsi l'imprégnation d'eau (Marga *et al.*, 2001). L'abondance de monomères mono- ou polyhydroxylés au sein de la cuticule régulerait les conditions microclimatiques de surface affectant les premiers stades de développement fongique. La présence relativement faible de tels composés au sein de la cutine de *V. candidans* au profit d'acides gras à longue chaîne (jusqu'à 30 atomes de

carbone) explique le caractère hydrophobe et déperlant de la surface foliaire de cette espèce.

L'application locale de monomères de cutine sur des feuilles de cultivars d'orge sensibles engendre une protection partielle contre *E. graminis* f. sp. *hordei*, les monomères à 18 carbones de longueur de chaîne étant plus actifs que ceux à 16 carbones (Schweizer *et al.*, 1996b). Toutefois, l'acide 16-hydroxypalmitique semble induire une réponse de défense car il protège une large gamme de cultivars d'orge face à une même souche d'*E. graminis*. Ce même composé a été identifié dans la cutine de *V. candidans* (hydrolyse chimique uniquement) et pourrait être impliqué dans la résistance à *E. necator*.

Schweizer *et al.* (2006b) ont observé que les feuilles traitées avec des monomères de cutine montraient un effet inhibiteur de pénétration par les appressoria, matérialisé par un nombre accru de lobes appressoriaux. Cette tentative infructueuse de pénétration s'observe également chez *V. candidans* et pourrait indiquer l'activation d'une défense basée sur la formation de papilles. Les monomères de cutine ne sont pas suffisants pour induire la gamme complète de réactions de défense et, de ce fait, d'autres signaux doivent contribuer à l'interaction. Cependant, ils constituent un signal primaire, pouvant être considérés comme éliciteurs et menant à la résistance systémique acquise dans le cas de l'oïdium de l'orge.

Les acides 9,10,18-trihydroxystéarique et 18-hydroxy-9,10-epoxystéarique, qui sont les principaux monomères de cutine identifiés en C₁₈, présentent l'effet le plus important dans l'élicitation de réaction de défense et dans la production d'H₂O₂ chez les hypocotyles de concombre (Fauth *et al.*, 1998).

3.3 Conclusion

L'essai utilisant de la cutine marquée comme substrat a confirmé une activité cutinase pariétale constitutive des conidies d'*E. necator*, vraisemblablement impliquée dans le processus initial de dégradation de la cutine. Si la composition chimique de la cutine constitutive des deux espèces de *Vitis* étudiées a pu être décryptée, la composition en monomères issus de l'hydrolyse enzymatique reste inconnue. Leur implication dans l'activation de la synthèse et de l'excrétion de cutinases fongiques d'*E. necator*, de même que l'induction de réactions de défense de l'hôte ou encore un effet fongitoxique reste à démontrer. L'utilisation d'une lipase (hydrolase d'esters de glycérols) ou d'une estérase moins spécifique aurait permis de déterminer les conditions réactionnelles adéquates à l'hydrolyse de la cutine. Les propriétés hydrophobes du substrat et les conditions spécifiques de l'activité de la cutinase n'ont pas permis de recréer *in vitro* le processus de libération de monomères de cutine. Le degré d'hydrolyse de cutine obtenu avec une cutinase reste cependant plus élevé qu'avec une lipase (20% contre 5% en poids du

polymère initial ; Gérard *et al.*, 1993). L'emploi de techniques de spectroscopie à infrarouge (FT-IR) permettrait une meilleure description des liaisons entre les différents constituants du polymère de cutine (Villena *et al.*, 2000), afin d'envisager un protocole de dépolymérisation plus efficace.

Chapitre IV : Contribution du compartiment cellulaire dans la résistance à *Erysiphe necator*

☞ Schnee S, Viret O, Gindro K. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. ***Physiological and Molecular Plant Pathology*** 2008, 72: 128-133.

1 Introduction

Le caractère biotrophe d'un pathogène se définit par la nécessité de dériver les ressources carbonées d'une cellule végétale vivante pour palier à ses besoins énergétiques (Mendgen et Hahn, 2002). La majorité des champignons phytopathogènes biotrophes ont la capacité d'établir une structure infectieuse spécialisée : l'haustorium. Dans le cas des Erysiphales, l'établissement de cette structure intracellulaire nécessite la pénétration préalable de la cuticule et de la paroi cellulaire. La réalisation d'une interaction compatible entre le pathogène et l'hôte implique plusieurs facteurs. D'une part, le pathogène doit se prémunir de sa reconnaissance par l'hôte, être capable de supprimer l'activation de défense (notamment les voies menant à une réaction d'hypersensibilité) ou encore disposer de moyens de détoxification des composés synthétisés par l'hôte en réponse à l'infection (Schulze-Lefert et Panstruga, 2003). D'autre part, la dérivation du flux de métabolites par le pathogène doit se faire sans détruire la cellule hôte.

Dans le cas d'une infection de *V. vinifera* par *E. necator*, l'interaction haustorium - cellule hôte constitue le véritable siège de l'établissement biotrophique (Heintz et Blaich, 1990). L'activation des mécanismes de défense cellulaires de l'hôte peut se définir comme l'ultime barrière de prévention de l'établissement de la relation biotrophique et de la colonisation de l'hôte. Différentes voies de défense ont été identifiées chez la vigne, se mettant en place contre les pathogènes fongiques. En étudiant l'interaction entre *V. vinifera* et *E. necator*, Heintz et Blaich (1990) ont observé une accumulation de composés phénoliques, associée à une activité peroxydase présente dans les parois cellulaires de la cellule hôte ainsi que les cellules voisines au site de formation de l'appressorium. Ces observations suggèrent qu'*E. necator* induit localement des mécanismes de défense au moment où l'hyphe de pénétration atteint la cellule hôte. Au sein du genre *Vitis*, ces réactions impliquent un stress oxydatif, une réaction d'hypersensibilité rapide et localisée menant à une nécrotisation cellulaire, et l'accumulation concomitante de PR-protéines (pathogenesis-related proteins) et de

métabolites tels que les stilbènes (Jeandet *et al.*, 2002). Alors qu'il est relativement difficile de définir le rôle exacte des PR-protéines dans l'inhibition du développement fongique, la fongitoxité des stilbènes est connue sur les autres pathogènes de la vigne tels que *Botrytis cinerea* et *Plasmopara viticola* (Langcake et Pryce, 1976; Pezet *et al.*, 2004a). Cependant, aucune information n'est disponible quant aux effets des stilbènes sur *E. necator*. Belhadj *et al.* (2006) ont démontré qu'un traitement préalable au méthyljasmonate sur un cultivar sensible, tel que *V. vinifera* cv Cabernet Sauvignon réduisait fortement le développement de l'oïdium. Ces mêmes auteurs ont montré que le méthyljasmonate induit la synthèse de resvératrol, de picéide, de ϵ - et δ -viniférine, et des traces de ptérostilbène dans les cellules épidermiques.

Ce travail présente l'activité de différents stilbènes purifiés sur les premiers stades de développement d'*E. necator*. Le contenu en stilbènes de disques foliaires artificiellement infectés, issus de feuilles de *V. vinifera* cv. Chasselas, d'hybrides interspécifiques IRAC 1999 et 2292, et de *Vitis candicans*, a été analysé qualitativement et quantitativement. La concentration de ces phytoalexines a été corrélée aux stades de développement infectieux d'*E. necator* sur ces divers hôtes.

2 Résultats

L'effet de concentration croissante de stilbènes sur les premiers stades infectieux d'*E. necator* a été évalué in vitro. Si aucune différence significative n'a pu être observée entre les concentrations appliquées pour chaque stilbène pur, une activité plus ou moins inhibitrice à forte concentration apparaît, exceptée pour la δ -viniférine (Figure 25). Le ptérostilbene est le seul composé présentant un effet biocide; la concentration causant 50% d'inhibition de la germination des conidies a été évaluée à 212 μ M (Figure 26).

Les observations microscopiques réalisées au chapitre I ont permis de comptabiliser le nombre de sites infectieux, matérialisés par la présence d'un appressorium (Figure 27). Les deux cultivars sensibles, sur lesquels *E. necator* développe son cycle de développement asexué complet, présentent un nombre d'appressoria s'accroissant proportionnellement à la dichotomisation des hyphes et la densité du mycélium résultant. Sur l'IRAC 1999, les hyphes issus d'une seule conidie ont développé en moyenne de 23.3 appressoria 5 jpi. Dans le cas de *V. vinifera* cv Chasselas, ce décompte est rendu impossible, dû à l'importante densité de mycélium (Figure 27D, E). Le nombre élevé d'appressoria hyphaux produit par une seule conidie sur les espèces sensibles contraste avec l'unique appressorium produit par conidie sur *V. candicans*.

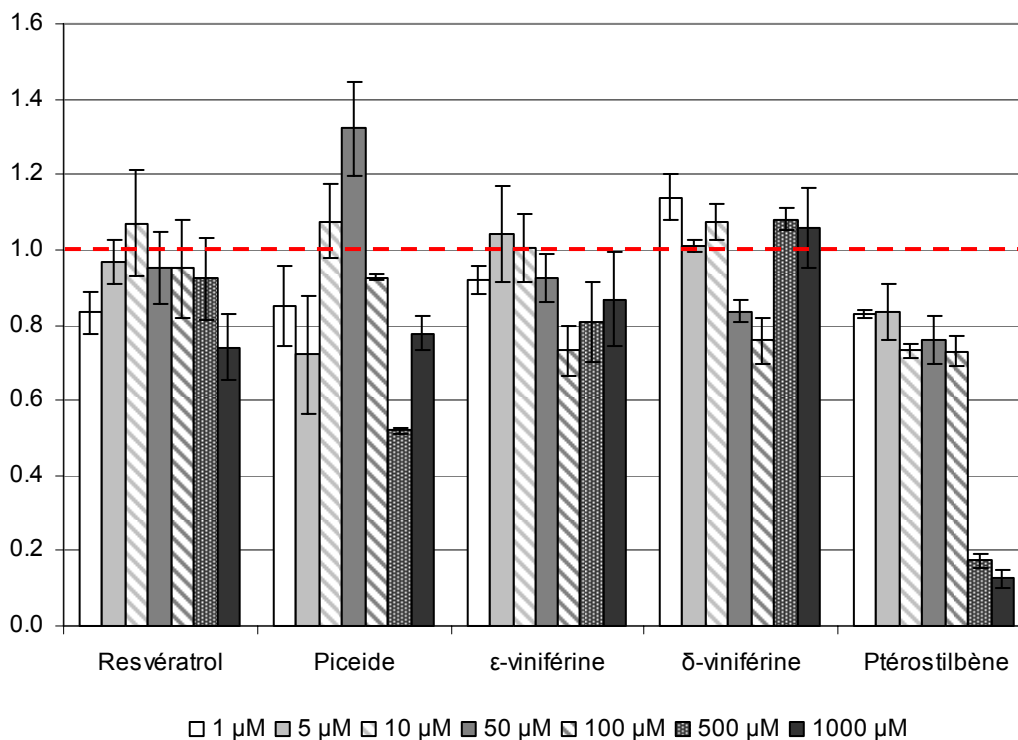


Figure 25 Effet d'une concentration croissante de stilbènes sur la germination des conidies d'*E. necator* 24 hpi. Les valeurs représentent la moyenne et l'erreur standard de 3 répétitions. Un minimum de 100 conidies a été observé par traitement, chaque traitement a été répété trois fois. L'axe des ordonnées représente le rapport du pourcentage de germination observé pour une concentration donnée de stilbène sur le pourcentage de germination observé sur le témoin, spécifique au composé étudié. La ligne rouge constitue la référence témoin.

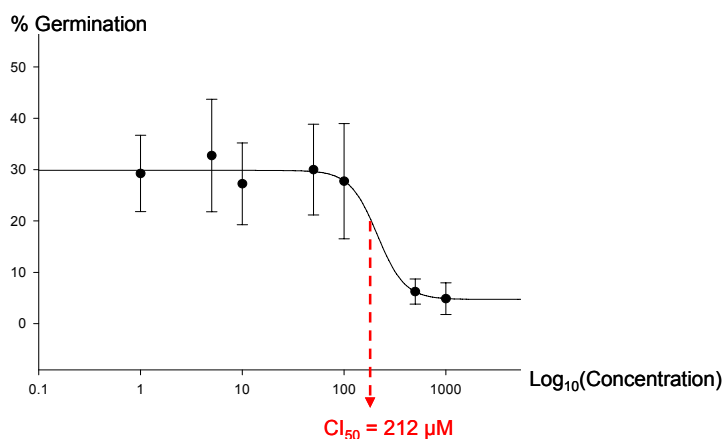


Figure 26 Calcul de la concentration de ptérostilbène permettant l'inhibition de 50% de la germination des conidies d'*E. necator* (CI₅₀), à partir d'une courbe sigmoïde "dose-réponse" (Sigmaplot regression wizard module)

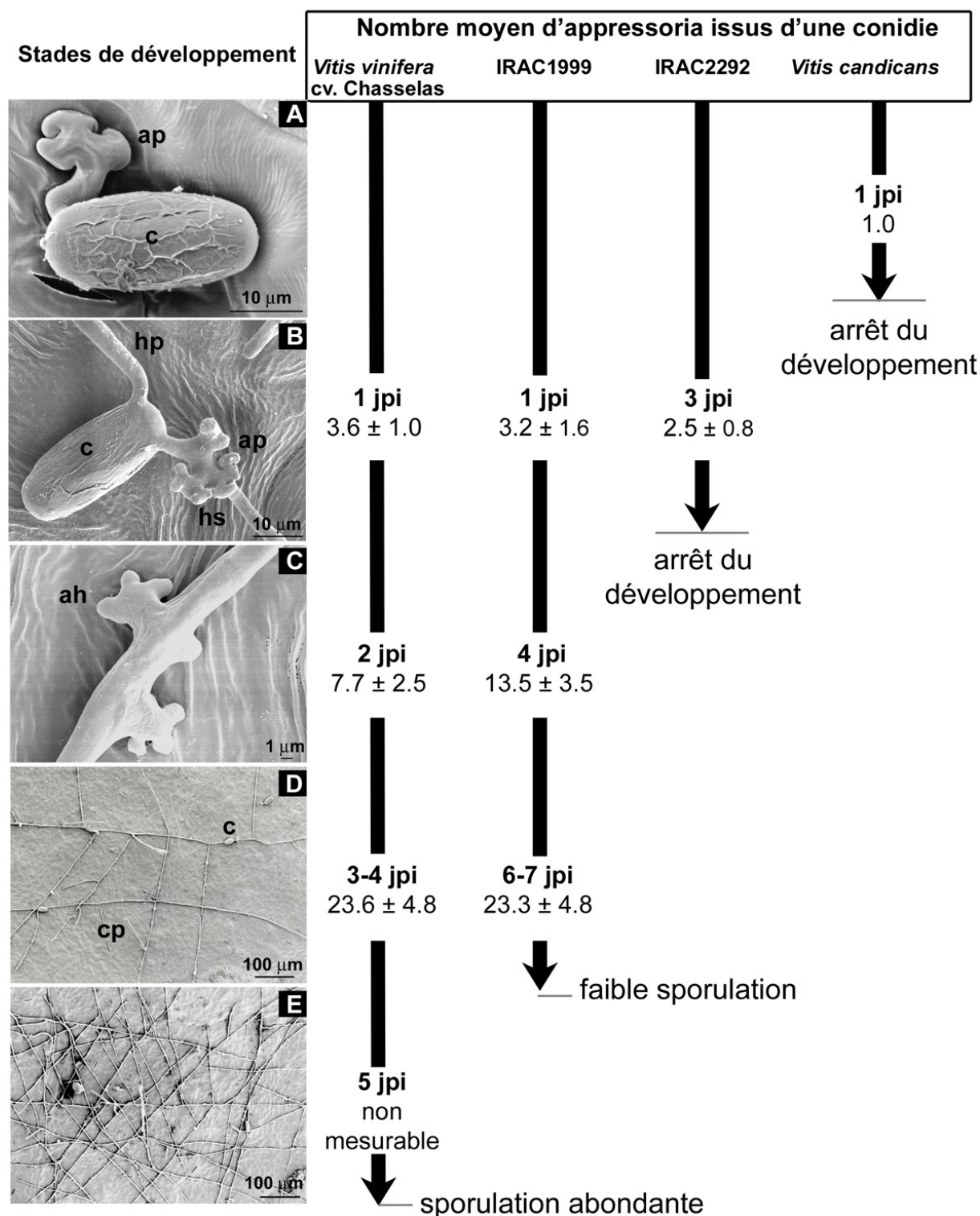


Figure 27 Séquences infectieuses d'*E. necator* sur quatre cultivars observés au MEB et comptabilisation du nombre de sites infectieux. A. formation du premier appressorium; B. Elaboration du second hyphe; C. Formation d'appressoria hyphaux; D. Réseau mycélien peu dense; E. Mycélium dense et ramifié. Les flèches noires indiquent le stade ultime atteint par *E. necator* sur chacun des cultivars testés, et le temps nécessaire pour atteindre chaque stade. La moyenne et l'écart-type du nombre d'appressoria formés à partir d'une conidie, sont mentionnés pour chaque stade atteint par le pathogène. Pour chaque disque foliaire, 150 à 200 conidies ont été comptabilisées. c: conidie; ap:

appressorium primaire; hp: hyphe primaire; hs: hyphe secondaire; ah: appressorium hyphal; cp: conidiophore.

L'analyse de contenu en phytoalexines dans une zone saine de l'épiderme foliaire située en périphérie d'une lésion sporulante sur Chasselas, et la lésion elle-même, a montré que les stilbènes ne peuvent être détectés que dans la zone d'infection et non dans l'épiderme sain, où seulement une faible quantité de *cis*-picéide est détectée (Figure 28).

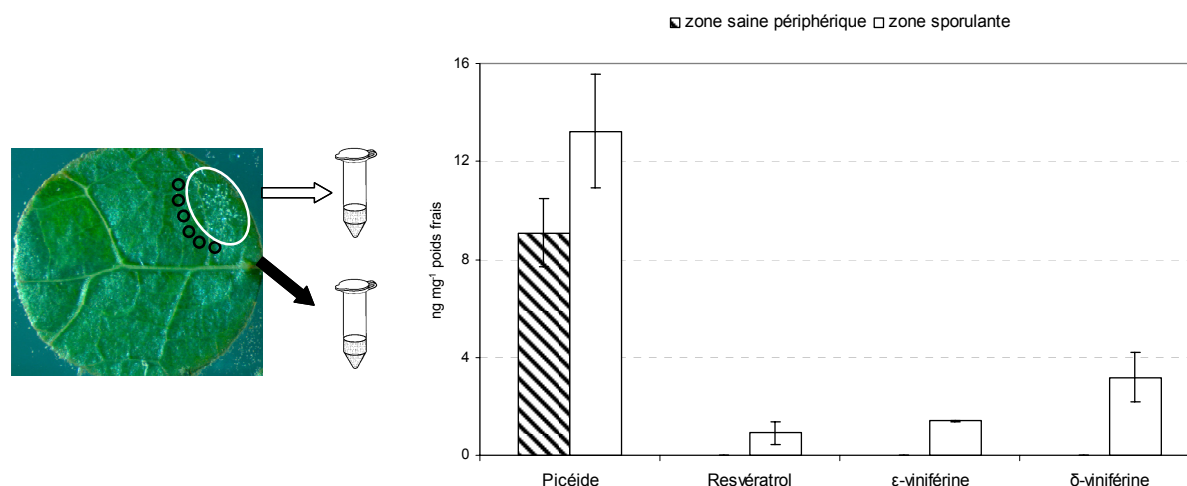


Figure 28 Comparaison du contenu en phytoalexines stilbéniques entre une zone sporulante et une zone périphérique saine, observées sur *V. vinifera* cv. Chasselas.

Afin d'évaluer le rôle des phytoalexines stilbéniques dans la résistance de la vigne contre l'oïdium, une analyse qualitative et quantitative des stilbènes des quatre cultivars a été réalisée de 1 à 5 jpi. Aucun stilbène n'a été identifié dans tous les échantillons de contrôle non infectés, indépendamment du cultivar testé. Alors que le ptérostilbène n'est jamais détecté, des trans-isomères de picéide, resvératrol, ε-viniférine, δ-viniférine ont été identifiés dans toutes les variétés étudiées, leur concentration variant considérablement en fonction des cultivars (Tableau 9). En comparaison des autres échantillons, la plus grande concentration de resvératrol est mesurée dans le Chasselas à 1 jpi. A 2 et 3 jpi, la quantité de resvératrol décroît tandis que celle de la picéide augmente, indiquant une importante glycosylation du resvératrol. La formation de δ-viniférine est concomitante avec celle de la picéide tandis que l'ε-viniférine apparaît seulement 3 jpi. Un schéma similaire de synthèse de stilbènes est observé pour l'IRAC 1999 tandis que pour l'IRAC 2292, peu de picéide est produite et la concentration de viniférines atteint son maximum 4 jpi (Tableau 10). Chez *V. candidans*, la production de picéide n'est pas détectée alors que le resvératrol est rapidement oxydé en ε- et δ-viniférine. Cependant, les concentrations de ces composés antifongiques sont plus faibles que celles mesurées dans les autres cultivars.

Tableau 9 Concentrations en phytoalexines stilbéniques produites par différents cultivars de vigne, de 1 à 5 jours après infection par *E. necator*.

Cultivars	jours	<i>trans</i> -piceide		<i>trans</i> -resveratrol		<i>trans</i> - ϵ -viniferin		<i>trans</i> - δ -viniferin	
		$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ^*	et*	$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ	et	$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ	et	$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ	et
<i>V. vinifera</i> cv Chasselas	1	2149	108	4174	130	0	0	1164	140
	2	2354	75	546	40	0	0	2893	228
	3	14885	423	573	56	1373	123	3888	324
	4	10919	286	486	9	495	44	2929	219
	5	18992	443	801	63	3872	228	4068	263
IRAC 1999	1	3716	162	2212	123	0	0	807	117
	2	29098	327	1227	29	2282	234	4297	215
	3	30489	268	349	9	396	41	1724	73
	4	26611	338	863	9	2096	54	6536	294
	5	20324	680	949	9	6622	164	11380	628
IRAC 2292	1	4490	190	882	59	192	0	609	73
	2	6129	142	1745	40	5279	100	3586	70
	3	7177	94	2271	26	8476	150	3547	73
	4	4576	85	1985	65	19933	159	11495	449
	5	7379	461	1462	687	5911	969	5722	878
<i>V. candidans</i>	1	0	0	333	9	158	9	664	23
	2	0	0	482	14	2669	31	6966	76
	3	0	0	813	42	2058	49	8939	170
	4	0	0	460	19	1760	46	3988	78
	5	0	0	266	15	2535	51	6359	143

* μ : moyenne; et: écart-type

Le nombre d'appressoria formés durant le développement d'*E. necator* comptés sur 5 jours permet de calculer les concentrations de stilbènes par nombre d'appressoria présents, à partir des concentrations mesurées dans les disques foliaires (Tableau 10). À partir de ces concentrations calculées, les viniférines sont en plus grande concentration par nombre d'appressoria dans le cultivar le plus résistant *V. candidans* 2 jpi, correspondant à l'arrêt total de la croissance fongique. Une production graduelle de viniférines est observée chez l'IRAC 2292 entre le troisième et le quatrième jour après inoculation, étroitement liée à l'inhibition du développement du pathogène.

Tableau 10 Calculs de la concentration en phytoalexines stilbéniques de différents cultivars de vigne de 1 à 5 jpi par *E. necator*, rapportée au nombre d'appressoria comptés.

Cultivars	jours	<i>trans</i> -piceide		<i>trans</i> -resveratrol		<i>trans</i> - ϵ -viniferin		<i>trans</i> - δ -viniferin	
		$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ^*	et*	$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ	et	$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ	et	$\mu\text{g mg}^{-1}\text{PF}$ μ	et
<i>V. vinifera</i> cv Chasselas	1	196.22	9.82	381.20	11.85	0.00	0.00	106.27	12.78
	2	74.37	2.36	17.26	1.26	0.00	0.00	91.42	7.19
	3	550.11	15.63	21.18	2.08	50.72	4.53	143.68	11.98
	4	279.60	7.32	12.43	0.24	12.68	1.12	75.01	5.61
	5	376.63	8.79	15.89	1.24	76.79	4.53	80.68	5.21
IRAC 1999	1	144.97	6.32	86.32	4.78	0.00	0.00	31.49	4.55
	2	1648.15	18.52	69.49	1.63	129.27	13.25	243.38	12.18
	3	1555.71	13.65	17.80	0.45	20.19	2.07	87.95	3.72
	4	673.45	8.56	21.83	0.24	53.04	1.36	165.41	7.45
	5	248.69	8.32	11.62	0.11	81.03	2.01	139.25	7.69
IRAC 2292	1	181.93	7.69	35.73	2.31	7.78	0.00	24.67	2.85
	2	258.82	8.07	73.68	2.28	222.93	5.68	151.41	3.95
	3	228.27	4.82	72.25	1.31	269.60	7.65	112.82	3.74
	4	149.22	2.15	64.71	1.65	649.90	4.02	374.80	11.36
	5	822.66	5.64	163.02	8.41	659.01	11.85	637.88	10.74
<i>V. candicans</i>	1	0.00	0.00	200.00	5.32	95.00	5.36	399.17	13.65
	2	0.00	0.00	264.13	7.58	1462.53	17.25	3817.33	41.56
	3	0.00	0.00	110.00	5.69	278.61	6.65	1210.00	22.95
	4	0.00	0.00	86.92	3.62	332.21	8.66	752.79	14.69
	5	0.00	0.00	22.74	1.25	216.84	4.32	543.95	12.25

* μ : moyenne; et: écart-type

3 Discussion

Les observations microscopiques du suivi infectieux d'*E. necator* sur des espèces de *Vitis* de sensibilité différente (chapitre I), ont été utilisées afin d'établir une correspondance entre le développement du pathogène et la synthèse de composés spécifiques aux réactions de défense. Le développement de l'oïdium sur chacun des quatre cultivars analysés présente des comportements différents, liés à leur niveau de résistance ou de sensibilité. Ce phénomène se matérialise par les réactions de défense de l'hôte et principalement par l'accumulation de phytoalexines aux sites d'infection. La synthèse de phytoalexines est considérée comme une réaction cruciale liée aux mécanismes de défense globale de la vigne (Langcake et Pryce, 1976; Hain *et al.*, 1993; Jeandet *et al.*, 2002). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle important des phytoalexines stilbéniques dans la résistance des *Vitis* contre les pathogènes fongiques majeurs tels que *B. cinerea* (Adrian *et al.*, 1997) et *P. viticola* (Pezet *et al.*, 2004a). Cependant peu d'informations sont disponibles sur la fonction des stilbènes dans les mécanismes de défense contre l'oïdium.

Une caractéristique spécifique des Erysiphales est la production de mycélium strictement à la surface de l'hôte (caractère ectophyte). En conséquence la formation des appressoria est obligatoire afin d'assurer la pénétration directe de l'hôte et permettre le développement d'infections ultérieures (Emmett, 1975). L'élaboration de l'hyphe de pénétration permettant la perforation de la cuticule et de la paroi cellulaire aboutit à la formation d'un haustorium. Cette structure fongique est étroitement liée à la membrane plasmique de l'hôte (Heintz et Blaich, 1990) et se révèle déterminante dans le processus d'interaction compatible. La reconnaissance du pathogène, à ce stade, génère la synthèse et la mobilisation de métabolites de défenses comme les phytoalexines, confinées aux cellules avoisinantes du site d'infection (Koh et Somerville, 2006; Schnee *et al.*, 2008). Les données, exprimées par poids de matière fraîche, semblaient être en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle les stilbènes, et en particulier les viniférines, sont fortement impliquées dans la résistance de la vigne contre l'oïdium. En effet, aucune distinction qualitative et quantitative n'est apparue entre cultivars sensibles et résistants. Cette observation peut être expliquée par une dilution significative de la quantité de stilbènes, due à la présence d'un grand nombre de cellules épidermiques saines, libres de phytoalexines. Cette hypothèse peut être validée si les stilbènes sont synthétisés uniquement aux sites d'infection, à savoir où l'hyphe infectieux de l'appressorium pénètre dans la cellule épidermique, et si aucun signal systémique n'est libéré afin d'induire la production de stilbènes dans des cellules non infectées. Les résultats confirment qu'aucun signal systémique n'est transféré aux cellules saines avoisinantes, indiquant que le développement des structures infectieuses au sein de la cellule épidermique dépend du niveau de résistance du cultivar. En conséquence, la quantification des

stilbènes doit être reliée au site d'infection, correspondant aux cellules réellement pénétrées par un hyphes infectieux. Cette observation peut expliquer le faible niveau transcriptionnel des gènes analysés dans l'étude de Fung *et al.* (2008) en réponse à une infection par *E. necator* sur le cultivar résistant *Vitis aestivalis*. Cependant, dans ce cas, le nombre de sites infectieux fonctionnels entre les géotypes sensible et résistant n'a pas été évalué, expliquant l'absence de différence significative dans l'expression de la stilbène synthase 24 hpi (Fung *et al.*, 2008).

Les haustoria d'*E. necator* ne s'établissent que dans la première couche de cellules épidermiques, tandis que *P. viticola* développe un mycélium intercellulaire qui envahit le mésophylle. De ce fait, le nombre exponentiel de cellules en contact avec le pathogène en croissance augmente l'induction de la synthèse de stilbènes (Pezet *et al.*, 2003; 2004b). La quantification des stilbènes par appressorium est donc essentielle, comparé à la quantité de stilbènes exprimée par poids frais, afin d'évaluer de manière aussi réaliste que possible le rôle des phytoalexines en tant que composés de défense contre l'oïdium. Les quatre cultivars testés sont capables de synthétiser les différents stilbènes mis en évidence chez la vigne, lors d'une infection d'*E. necator*, excepté pour la picéide absente chez *V. candicans*. Cependant, tous les stilbènes ne disposent pas d'une toxicité égale envers les pathogènes de la vigne (Pezet et Pont, 1995; Pezet *et al.*, 2004a). L'activité antifongique des différents stilbènes purifiés a été évaluée sur la germination des conidies d'*E. necator*, afin d'établir un seuil de toxicité pour chacun de ces composés. Une faible activité anti-germinative à forte concentration a été observée. Cette absence d'effet peut s'expliquer par la faible diffusion des stilbènes à travers la paroi des conidies. A contrario, le complexe haustorial qui assure l'absorption des nutriments pour le parasite (Mendgen et Hahn, 2002), est en contact étroit avec les métabolites potentiels de défense de l'hôte. Il est envisageable que la toxicité de chaque composé soit similaire à celle observée contre deux autres pathogènes fongiques de la vigne, à savoir *P. viticola* et *B. cinerea* (Dercks et Creasy, 1989; Pezet *et al.*, 1995). Selon ces auteurs, le resvératrol et la picéide ne sont pas toxiques contre ces champignons. Romero-Pérez *et al.* (2001) ont montré que la concentration de ces deux composés dans la peau des baies de raisins de cultivars sensibles de vigne augmentait, en corrélation avec la sévérité de la maladie, observée au vignoble. Ceci démontre que la seule accumulation de ces composés n'est pas capable d'interrompre la croissance du pathogène. Les viniférines, dimères oxydés du resvératrol (Pezet *et al.*, 2004b), sont employées comme marqueurs de résistance dans l'évaluation du comportement des vignes au mildiou (Gindro *et al.*, 2006). Dans le cas d'une infection due à l'oïdium, la synthèse de δ - et de ϵ -viniférine au site d'infection semble être étroitement liée à l'inhibition du développement de la maladie. *V. candicans* est capable de produire rapidement une grande quantité de viniférines, tandis que l'IRAC 2292 les accumule de manière plus lente aux sites

d'infection. L'accumulation des deux isomères de viniférines coïncide avec l'interruption du développement du pathogène, à savoir 2 jpi chez *V. candidans* et 4 jpi chez IRAC 2292. Le fait que la picéide ne soit pas détectée chez *V. candidans* peut supposer une totale oxydation du resvératrol en viniférines. Un parallèle peut être fait dans le cas d'une infection au mildiou décrit par Pezet *et al.* (2004b). La réponse à la pénétration du pathogène et/ou à la formation de l'haustorium mène à une rapide induction de la stilbène synthase (Richter *et al.*, 2005), caractérisée par une importante synthèse de resvératrol maintenue après l'infection. Chez les cultivars sensibles, le resvératrol est principalement glycolysé en picéide non toxique, et la faible concentration de viniférines est insuffisante pour inhiber la croissance du pathogène. À l'inverse, chez les cultivars résistants, le resvératrol est oxydé en viniférines, dont les concentrations peuvent avoir un effet toxique rapide sur l'haustorium, comme le témoigne l'observation de l'arrêt du développement du pathogène (Chapitre I). La précocité de reconnaissance du pathogène et la synthèse rapide de resvératrol de même que sa rapide oxydation semblent accroître le niveau de résistance à l'oïdium des cultivars de vigne.

Il est important de noter que le ptérostilbène, la forme méthylée du resvératrol, est le seul composé montrant une activité toxique sur les conidies d'*E. necator*. Pezet *et al.* (1995) ont montré que le ptérostilbène est aussi toxique que les viniférines contre *P. viticola* (CI₅₀=30 µM) et *B. cinerea* (CI₅₀=50 µM). Cependant, il n'a jamais été identifié dans les échantillons en réponse à une infection d'*E. necator*.

En conclusion, la synthèse de phytoalexines stilbéniques contribue fortement à l'établissement des mécanismes de résistance contre l'oïdium de la vigne. La localisation de stilbènes au site d'infection aussi bien que leur concentration et leur cinétique de synthèse, sont en accord avec la définition du rôle de tels composés dans les mécanismes de défense, décrit par Hammerschmidt (1999) et Treutter (2005).

Les résultats montrent que les viniférines synthétisées en relation avec le nombre d'appressoria formés, constitue un marqueur de résistance contre *E. necator*. Ce marqueur pourrait être employé dans l'appréciation du potentiel de défense de nouveaux cultivars de vigne au sein de programme de sélection.

Chapitre V : Identification de QTL de résistance à *Erysiphe necator* issus de *V. vinifera* cv Bronner

1 Introduction

La viticulture actuelle repose sur l'exploitation de cépages de vigne (*Vitis vinifera* L.) traditionnels, greffés sur des porte-greffes résistants à *Phylloxera vastatrix*. Les améliorations d'itinéraires culturaux de ces variétés associées à une protection phytosanitaire chimique, assure la viabilité de la production de raisin de cuve (Grando *et al.*, 2003). La recommandation d'une protection efficace des plantes cultivées plus respectueuse de l'environnement, conduit au développement de nouveaux outils en matière de sélection variétale. La création d'individus naturellement résistants aux différentes maladies fongiques et exprimant un potentiel aromatique similaire aux variétés actuellement exploitées, est une alternative intéressante à l'application de produits phytosanitaires. Ces nouveaux schémas de sélection reposent sur l'introgression de caractères d'intérêts d'espèces sauvages de *Vitis* dans le fond génétique de cultivars de *V. vinifera* afin d'obtenir des individus présentant un bon niveau de résistance aux pathogènes et une qualité agronomique et organoleptique optimale (Akkurt *et al.*, 2007). La création de tels cultivars par un schéma de sélection classique nécessite des investissements en temps et en main d'œuvre et de coût, pour évaluer et valider les phénotypes d'intérêt. Le développement de nouveaux cultivars requiert de 20 à 25 ans depuis le croisement initial jusqu'à la mise sur le marché.

Le développement de la sélection assistée par marqueurs a bénéficié de l'essor récent des technologies de biologie moléculaire (basées sur la technique de PCR) et la compréhension des mécanismes de transmission et de distribution des caractères dit quantitatifs (QTL, quantitative trait locus) a contribué à l'accélération des schémas de sélection. Si les marqueurs moléculaires de type RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ont été employés dans les premières cartographies (Dalbó *et al.*, 2001; Grando *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2004) pour l'obtention rapide de cartes génétiques (Welter *et al.*, 2007), ils ne permettent pas de transférer les informations à d'autres génotypes et de comparer les cartes génétiques entre elles (Adam-Blondon *et al.*, 2004).

Les microsatellites sont des courtes séquences de motifs répétés en tandem, abondantes sur l'ensemble du génome des eucaryotes (De Vienne, 1998). La combinaison de leurs propriétés (conservation, haut degré de polymorphisme, transmission de type mendélienne, co-dominance, spécificité à un locus, détection basée sur la PCR) en fait

des marqueurs fiables et pertinents pour l'analyse génétique. Le nombre croissant de microsatellites caractérisés au sein de la vigne et leur combinaison possible en multiplexes d'amplification par PCR et de séparation de taille d'allèles (Merdinoglu *et al.*, 2005) a accru leur emploi dans la cartographie génétique.

L'établissement d'une carte génétique se base sur la disponibilité d'une descendance en ségrégation issue d'un croisement, et de la caractérisation génotypique des individus de la descendance. Des études statistiques de lien/recombinaison des marqueurs moléculaires, permet d'estimer les distances entre les marqueurs ainsi que leur agencement sur les groupes de liaisons. Les cartes génétiques permettent de localiser les facteurs génétiques impliqués dans la variation de caractères d'intérêt.

La première étude du déterminisme génétique de la résistance à l'oïdium de la vigne a montré l'existence d'un locus simple, responsable de la gouvernance du caractère. Cette résistance en provenance de *Muscadinia rotundifolia* est liée à Run1 (Resistance against *U. necator*), locus dominant du groupe de liaison 12 qui contient deux familles de RGA (resistance genes analogs) (Bouquet, 1986; Pauquet *et al.*, 2001; Donald *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 2005). Dalbó *et al.* (2001) et Fischer *et al.* (2004) ont mis en évidence des QTLs liés à la résistance à *E. necator*, respectivement issus d'un croisement [Horizon x Illinois547-1 (hybride entre *V. rupestris* et *V. cinerea*)] et d'un croisement [Regent x Lemberger].

Le cépage Bronner [Merzling x Gm64-93] présente un niveau de résistance intéressant aux maladies fongiques, par la présence de *Vitis* américains (*V. rupestris*, *V. lincedumii*) dans sa généalogie (Brown *et al.*, 1999). Mais l'important fond génétique de *V. vinifera* lui confère des qualités organoleptiques exploitables et un intérêt en sélection variétale. L'objectif de ce travail est d'évaluer la ségrégation du caractère de résistance à *E. necator* au sein d'une population de vigne, afin de déterminer les facteurs génétiques (QTL) liés à la variation de ce caractère, spécifiques au parent Bronner.

2 Résultats

2.1 Distribution des différents caractères phénotypiques au sein de la population

Le commentaire se porte sur l'analyse des résultats obtenus des critères phénotypiques des 94 individus sélectionnés pour le génotypage. D'une manière générale, le caractère de résistance ségrège dans la sous-population analysée, confirmant l'existence de facteurs génétiques. L'absence de sporulation a été observée sur six individus de la sous-population. La moitié des génotypes de la population ont montré un nombre important de disques sporulants (Figure 29A). Deux tiers des génotypes présentent une

surface sporulante inférieure à la moitié du disque foliaire, le tiers restant exposant une sporulation répartie sur plus de la moitié du disque (Figure 29B). Le critère d'intensité de sporulation est également réparti sur la population. Une forte densité de conidiophores s'observe sur la moitié des génotypes (Figure 29C). Si un grand nombre de disques sporulants a été observé, la sporulation reste modérée. En effet, l'index de sensibilité indique que plus de la moitié des individus présentent un certain niveau de résistance à *E. necator* (indice inférieur à 25, Figure 29D). Les génotypes moyennement sensibles sont au nombre de 17 tandis que les individus présentant une sensibilité plus importante au pathogène (indice supérieur à 50) constituent 22% des génotypes testés.

Les infections réalisées sur les disques foliaires ont été homogènes (Figure 30). Les génotypes utilisés dans chaque série expérimentale en tant que témoin, montrent une faible variabilité de réponse à chaque critère phénotypique. Aucune sporulation n'a été détectée sur Bronner, parent du croisement de la population d'étude.

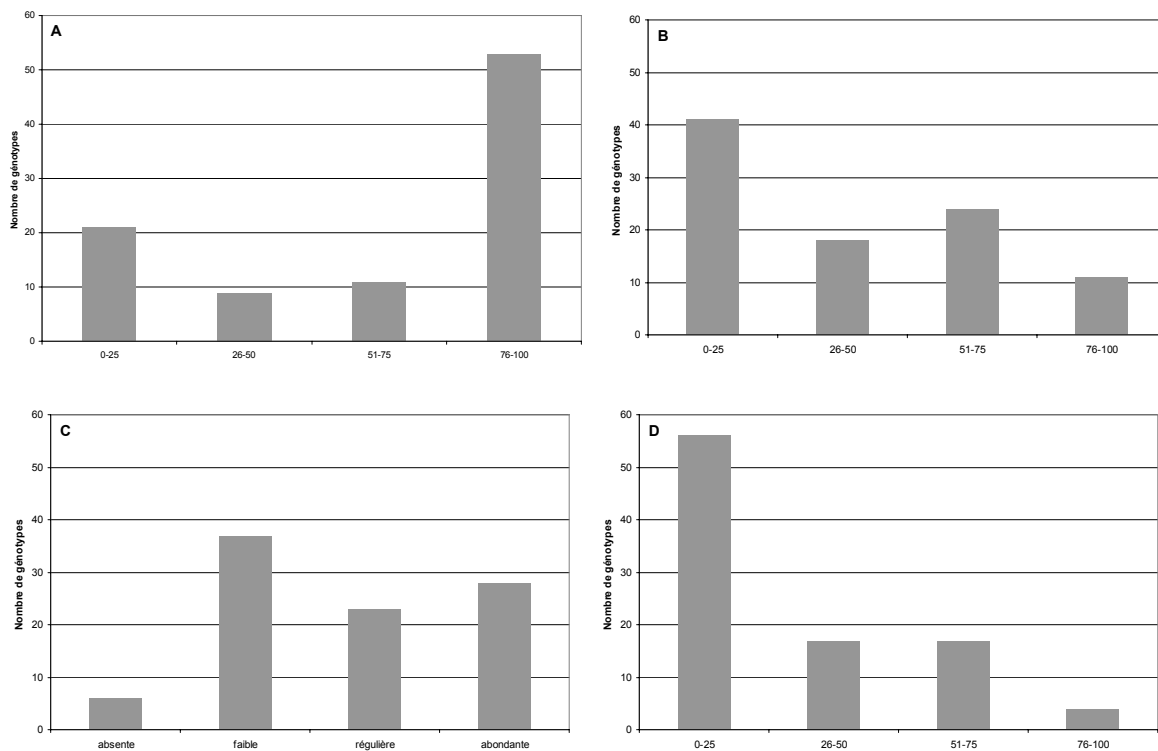


Figure 29 Distribution des génotypes de la sous-population (n = 94) pour chaque critère phénotypique. A. Pourcentage de disques sporulants, B. Surface sporulante moyenne (%), C. Intensité de la sporulation, D. Index de sensibilité.

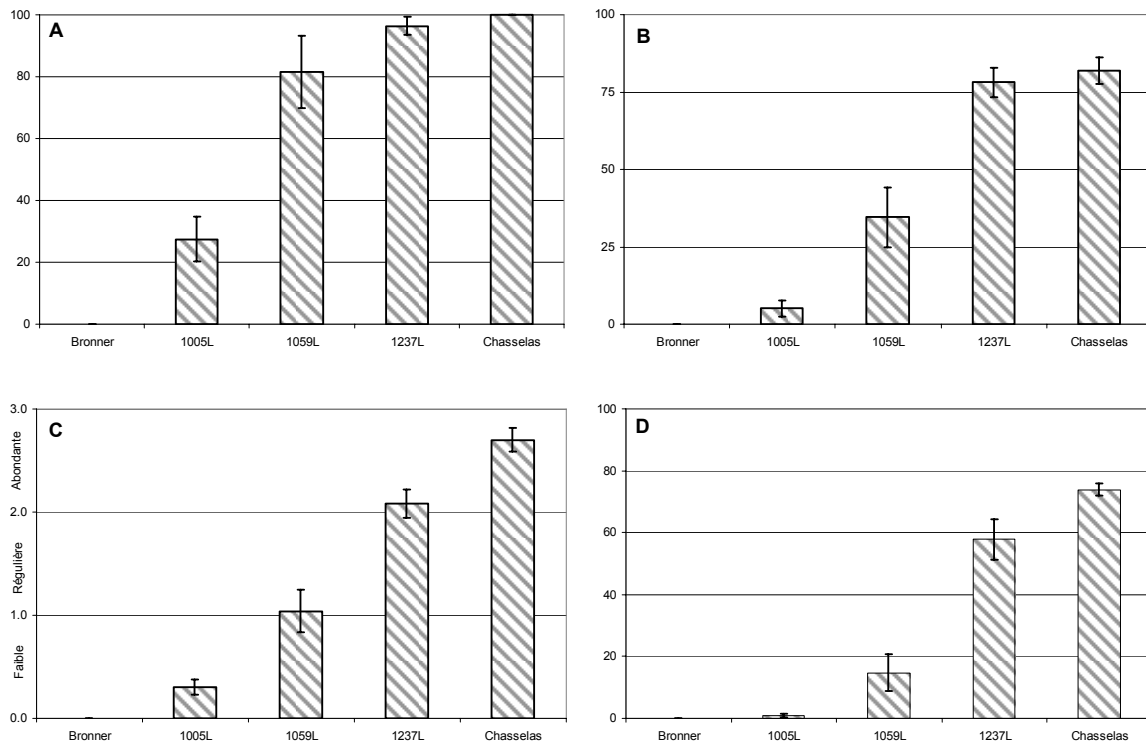


Figure 30 Variabilité des critères phénotypiques évalués sur les génotypes inclus dans chaque expérimentation. A. Pourcentage de disques sporulants, B. Surface moyenne sporulante (%), C. Intensité de la sporulation, D. Index de sensibilité. Les valeurs représentent la moyenne et l'erreur standard de 6 répétitions.

2.2 Détection de QTL

Sur les 83 marqueurs hétérozygotes sélectionnés, 62 ont amplifié correctement et 50 ont affiché une ségrégation sans distorsion dans la descendance, participant à la détection de QTL sur chaque critère phénotypique.

Huit marqueurs sont liés aux différents caractères phénotypiques étudiés (Tableau 10): 5 présentent un effet sur l'ensemble des caractères, 3 sont spécifiques à un caractère particulier. D'une manière générale, la proportion de la variation phénotypique expliquée par chaque locus-marqueur est peu importante (entre 5 et 23%). Le marqueur VViv67 explique entre 13 et 17% de la variabilité des critères et la distribution de l'allèle "g" du parent Bronner, qui réduit significativement la sensibilité à l'oïdium. Le marqueur VVin74 présente la meilleure explication des caractères phénotypiques (entre 12 et 23%). Toutefois, le faible effectif d'individus ayant amplifié ce marqueur tend à modérer ce résultat. L'allèle "e" distribué par le parent hybride femelle restreint significativement la sensibilité à l'oïdium.

Les allèles des marqueurs VMC2e7 (Bronner), VMC1f10 et VMCN4b9 (hybride RC5) explique une faible partie de la variabilité des caractères (entre 5 et 8%).

Les effets liés aux marqueurs VMC4d4, VMC2e11 et VVIn16, spécifiques aux caractères de surface de sporulation et de nécroses spontanées, ne proviennent que du parent Bronner.

Tableau 10 Marqueurs liés aux critères phénotypiques de résistance (^a d'après Doliguez *et al.*, 2006; ^b valeur du X^2 théorique pour un risque d'erreur de 5%: $n=1$ $X^2_{th} = 3.84$, $n=2$ $X^2_{th} = 5.99$, $n=3$ $X^2_{th} = 7.81$; ^c DS: pourcentage de disques sporulants, SS: surface sporulante moyenne, IS: intensité de la sporulation, Index: index de sensibilité; ^d ♀: *M. rotundifolia*, ♂: Bronner).

Marqueur	Groupe de liaison attendu ^a	Encodage	X^2 ^b	Nombres d'individus validés	Critère phénotypique ^c	P (Kruskal-Wallis)	Origine ^d	μ (allèle 1)	μ (allèle 2)	P (ANOVA)	R^2
VViv67	15	<efxeg>	5.182	88	DS	0.005	♂	e = 79.50	g = 49.20	< 0.0001	0.17
					SS	0.005	♂	e = 44.72	g = 24.27	0.001	0.14
					IS	0.005	♂	e = 1.58	g = 0.86	<0.0001	0.17
					Index	0.005	♂	e = 32.51	g = 15.60	0.003	0.13
VVIn74	19	<efxeg>	2.805	41	DS	0.01	♀	e = 60.46	f = 84.60	0.029	0.12
					SS	0.01	♀	e = 27.90	f = 51.16	0.014	0.23
					IS	0.05	♀	e = 1.08	f = 1.80	0.017	0.17
					Index	0.05	♀	e = 18.07	f = 40.86	0.008	0.23
VMC2e7	3	<nnxnp>	1.136	88	DS	0.05	♂	n = 54.89	p = 72.12	0.031	0.05
					SS	0.05	♂	n = 26.46	p = 41.04	0.022	0.06
					IS	0.01	♂	n = 0.93	p = 1.46	0.009	0.07
					Index	0.01	♂	n = 16.22	p = 30.62	0.011	0.07
VMC1f10	8	<llxlm>	0.953	85	SS	0.05	♀	l = 44.78	m = 27.76	0.009	0.08
					IS	0.05	♀	l = 1.51	m = 1.05	0.028	0.06
					Index	0.05	♀	l = 33.16	m = 18.68	0.013	0.07
VMC4d4	4	<nnxnp>	1.458	83	SS	0.05	♂	n = 41.97	p = 27.15	0.022	0.06
VMCN4b9	6	<llxlm>	0	82	SS	0.05	♀	l = 28.10	m = 41.56	0.042	0.05
					IS	0.05	♀	l = 1.00	m = 1.47	0.025	0.06
					Index	0.05	♀	l = 17.60	m = 31.60	0.015	0.07
VMC2e11	9	<efxeg>	0.213	89	NS	0.005	♂	e = 0.41	g = 0.07	<0.0001	0.16
VVIn16	18	<abxcd>	1.913	92	NS	0.05	♂	c = 0.11	d = 0.38	0.003	0.09

3 Discussion

La carte génétique du croisement étudié a permis d'établir 12 groupes de liaison, par l'association de 43 marqueurs. La distance entre les marqueurs positionnés et l'absence de 7 groupes de liaison limite la robustesse de l'analyse de cartographie d'intervalle pour la détection de QTL. La carte génétique n'est donc pas présentée dans ce travail, du fait d'un manque de disponibilité en marqueurs hétérozygotes pour le parent Bronner, afin de couvrir l'ensemble du génome. Une détection robuste de QTL nécessite une saturation maximale et une distribution homogène des marqueurs sur la carte génétique (Fischer *et al.*, 2004).

Toutefois, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, ne nécessitant pas de carte de liaison, a permis de mettre en évidence des loci étroitement liés aux critères d'évaluation de la résistance à *E. necator*. L'analyse de variance conjointe a précisé l'origine parentale du QTL détecté et la part de variation phénotypique expliquée par le locus-marqueur, pour chacun des critères étudiés. Le marqueur VViv67 ressort de l'analyse comme étant le plus associé avec une région chromosomique d'intérêt gouvernant le caractère de résistance (seuil de significativité inférieur à 0.005 pour tous les critères phénotypiques). Le caractère "nécroses spontanées" est étroitement lié au marqueur VMC2e11, qui n'intervient pas dans l'explication des autres critères phénotypiques. Ce caractère est transmis par le géniteur mâle et confirme l'observation de tels symptômes spécifiques à Bronner après infection par *E. necator*. Globalement, les deux géniteurs participent à la distribution de facteurs de résistance à l'oïdium.

3.1 Pertinence des critères phénotypiques

Le caractère de résistance à *E. necator* a montré une ségrégation continue dans la descendance, supportant l'hypothèse de QTL comme déterminant génétique. Les critères phénotypiques utilisés dans cette étude ont eu pour but d'être plus précis que la nomenclature OIV, employée jusqu'alors (Fischer *et al.*, 2004), et leurs distributions continues dans la descendance ont permis l'analyse de détection de QTL. Le biotest développé trouve son intérêt en s'affranchissant de la variabilité des notations des infections en conditions naturelles (par exemple Welter *et al.*, 2007) et offre une réponse plus précise sur l'expression du génotype. Toutefois, l'absence de forte liaison significative entre loci-marqueur et caractères phénotypiques peut être expliquée par la grande variabilité phénotypique observée au sein de chaque classe génotypique. Cette variabilité limite la distinction de différence significative et remet en cause la précision de la mesure des critères phénotypiques employés. De nouveaux critères plus objectifs devraient être développés afin de se soustraire de la subjectivité des mesures et donc de la variabilité engendrée. L'imagerie (HyphArea; Seiffert et Schweizer, 2005) ou la PCR

quantitative sont envisageables pour estimer la biomasse fongique, mais pose pour l'instant des problèmes respectifs de mise au point et de coût. Une tentative de mesure de sporulation par spectrophotométrie n'a pas abouti à une corrélation fiable entre niveau de résistance et quantité de conidies mesurée. L'utilisation d'un compteur de cellules s'affranchirait des biais provoqués par la présence de nombreux débris biologiques, déposés lors de l'inoculation.

Aussi, l'élaboration de critères phénotypiques précis afin d'évaluer à quel stade infectieux se manifeste la résistance, constitue également une voie d'investigation pour une meilleure caractérisation de l'expression des QTL. Les phytoalexines stilbéniques ont été mesurées à 48 hpi, mais aucun marqueur ne fut associé à la synthèse des différentes stilbènes, du fait d'une forte variabilité phénotypique au sein d'un même génotype. En outre, il est possible que le choix du timing pour la mesure du contenu stilbénique ne corresponde pas à la manifestation principale de la synthèse de phytoalexines, nécessaire à l'arrêt de l'infection.

3.2 Outils d'investigations

La conservation de séquences flanquantes des microsatellites au sein de cultivars de même que d'espèces proches du genre *Vitis*, permet la réunion d'informations issues de différentes études de cartographie génétique. Les cartes consensus disponibles (Grando *et al.*, 2003; Doligez *et al.*, 2006) ancrent les marqueurs distribués sur le génome de différents croisements de *Vitis* et évaluent la stabilité des QTLs par l'intermédiaire des locus-marqueurs qui leur sont étroitement liés. La carte génétique obtenue est conforme à la carte consensus, ce qui confirme le positionnement des marqueurs d'intérêt, identifiés dans cette étude.

L'identification de régions chromosomiques contrôlant des caractères quantitatifs de résistance aux pathogènes fongiques par une analyse QTL est la première étape de la caractérisation des facteurs de résistance (Welter *et al.*, 2007). La détection de QTL permet de localiser grossièrement de tels facteurs génétiques, mais l'identification de gènes impliqués nécessite une cartographie physique, fastidieuse à générer. Du fait que les microsatellites étaient principalement identifiés dans des régions non-codées, des EST (Expressed Sequence Target) ont été intégrées dans la cartographie de QTL (Bowers *et al.*, 1996). Ces cartes fonctionnelles permettent de mieux caractériser les QTL dans la compréhension des facteurs génétiques impliqués dans l'expression du caractère considéré. En conséquence, la localisation de régions riches en gènes de résistance permet de déterminer une correspondance entre un locus-marqueur ségrégant pour le caractère de résistance à *E. necator* et un ensemble de gènes impliqués dans les réactions de défense. Les gènes de résistance analogues sont généralement regroupés sous forme de groupements (Di Gaspero *et al.*, 2002) et parfois observés à la proximité

de QTL. Face à une infection à l'oïdium, Donald *et al.* (2002) ont identifié 3 RGA liés à *M. rotundifolia*, ségrégant avec le phénotype résistant dans la progéniture. Leurs positions chromosomiques sont conservées parmi les taxa botaniques même si la fonctionnalité reste dépendante de la variation de la combinaison allélique (Di Gaspero *et al.*, 2007). *De novo*, la disponibilité de ces informations permet de faire le lien avec les résultats obtenus.

3.3 QTL détectés

L'absence de la sous-population ayant Rpv1 et par conséquent Run1, puisque ces deux QTL sont étroitement liés (Merdinoglu *et al.*, 2003) permet d'évaluer le ou les QTL propres à Bronner. Si ce parent apporte effectivement 5 QTL de résistance, identifiés dans cette étude, le parent hybride femelle contribue également au caractère de résistance à travers la distribution d'allèles à effet significatif aux marqueurs VVIn74, VMC1f10 et VMCN4b9.

Un QTL lié à la résistance à l'oïdium a été identifié sur le groupe de liaison 15 chez l'hybride Regent [(Sylvaner x Müller-Thurgau) x Chambourcin] (Fischer *et al.*, 2004) encadré par les marqueurs VVIv67 et UDV-015 (Akkurt *et al.*, 2007). Cette région chromosomique a été référencée par Di Gaspero *et al.* (2007) comme ayant un groupe de gènes de résistance, contenant vraisemblablement des facteurs génétiques de résistance. Akkurt *et al.* (2007) ont développé un SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) dans cette région, hautement corrélé avec la résistance à l'oïdium dans une population en ségrégation. Les résultats obtenus confirment la présence d'un QTL dans le voisinage du marqueur VVIv67 en provenance de l'hybride Bronner. La présence de *Vitis* américains communs dans les généalogies respectives de Bronner et de Regent, et l'héritabilité de cette région chromosomique explique cette similitude de localisation. Welter *et al.* (2007) ont réaffirmé la présence d'un QTL majeur sur le groupe liaison 15 provenant de Regent, expliquant respectivement 57 et 64% de la variabilité du caractère de résistance des feuilles et des baies à *E. necator*. Même si l'effet lié à VVIn74 est à prendre avec précaution, il est positionné à une courte distance d'un groupe de gène de résistance (< 3 cM) sur le groupe de liaison 19 (Di Gaspero *et al.*, 2007). Les marqueurs VMC2e7 et VMC2e11 sont situés respectivement sur les groupes de liaison 3 et 11 de la carte consensus, et distants d'un gène de résistance inférieur à 10 cM. Enfin, le marqueur VVIn16 se situe au sein du groupe de liaison 18, particulièrement riche en gènes de résistance (Di Gaspero *et al.*, 2007). Si Fischer *et al.* (2004) et Akkurt *et al.* (2007) identifient un QTL unique de résistance à l'oïdium en provenance de Regent, plusieurs allèles de Bronner positionnés sur différents groupes de liaison ont été mis en évidence avec un effet mineur et confirment la distribution continue observée des phénotypes. Les

bases génétiques de la résistance à l'oïdium sont complexes et différent en fonction de l'origine des géniteurs employés dans les croisements.

3.4 Conclusion

Cette étude a été établie afin d'élucider le déterminisme génétique du caractère quantitatif de résistance à *E. necator* au sein d'une population d'hybrides résultant du croisement entre un hybride de 5^e génération de *Muscadinia rotundifolia* et *Vitis vinifera* cv Bronner. Dans l'étude de la descendance du croisement, il apparaît que les deux géniteurs contribuent à l'apport de facteurs de résistance. Toutefois, le parent Bronner apporte un QTL de résistance à l'oïdium dans le voisinage du marqueur VVIv67, localisé sur le groupe de liaison 15. Ce travail va se poursuivre par l'identification d'autres marqueurs hétérozygotes chez Bronner, afin d'accroître le taux de saturation de la carte génétique et réaliser la détection de QTL par cartographie d'intervalle. Cette méthode calcule pour chaque position du génome la vraisemblance de présence d'un QTL en ségrégation. La puissance de détection est bien supérieure à l'analyse de variance, utilisée dans cette étude, qui évalue uniquement l'association marqueur/caractère.

Le développement d'une cartographie fine au moyen d'un nombre plus important de marqueurs moléculaires sera possible par la disponibilité du génome complet de *V. vinifera* cv Pinot Noir (Jaillon *et al.*, 2007). Ceci permettra l'identification de gènes candidats basés sur la localisation de QTL et l'étude de l'expression différentielle de gène.

La disponibilité de marqueurs microsatellites étroitement liés au caractère de résistance à *E. necator*, ouvre de nombreuses perspectives en matière de sélection variétale assistée par marqueurs, ainsi qu'une meilleure compréhension de l'interaction hôte-pathogène. L'identification de régions chromosomiques liées au phénotype résistant permet d'évaluer la contribution de chaque QTL dans l'explication du caractère considéré. De telles études participent à caractériser les différentes sources de résistance aux maladies fongiques présentes au sein du genre *Vitis*. Si l'espèce *M. rotundifolia* a été largement étudiée (Bouquet *et al.*, 2000; Pauquet *et al.*, 2001; Donald *et al.*, 2002), d'autres cultivars tels que Regent (Fischer *et al.*, 2004) et le Merzling (Salmaso *et al.*, 2008) font l'objet d'une caractérisation de leurs sources de résistance afin de valider leur utilisation dans les programmes de sélection. La disponibilité de séquences flanquantes des régions d'intérêt permettra de suivre la transmission du caractère de résistance à l'oïdium dans la descendance des nouveaux croisements utilisant Bronner comme géniteur. Ces résultats préliminaires doivent permettre d'évoluer vers l'obtention d'une résistance quantitative durable au sein d'hybrides de *V. vinifera*.

Discussion générale

L'oïdium constitue une maladie économiquement importante de la vigne cultivée. L'absence complète de protection sanitaire engendre une perte totale de récolte, et une réduction de rendement est fréquemment observée si les fongicides sont appliqués après l'établissement de l'infection. Le contrôle exclusif de la maladie par l'utilisation de produits phytosanitaires ne constitue pas une voie satisfaisante, et nécessite l'élaboration de stratégies alternatives intégrant les enjeux environnementaux et sociaux conjoncturels.

Les objectifs de ce travail de recherche sont d'apporter des éléments nouveaux de compréhension de la base biochimique et génétique de l'interaction entre *Erysiphe necator* et les espèces du genre *Vitis*. Les premiers stades infectieux ont été étudiés en relation avec les différents compartiments cellulaires de l'hôte traversés par le pathogène jusqu'à l'établissement de l'interaction biotrophique durable. Le suivi du comportement d'*E. necator* sur des hôtes exprimant une gamme variable de réceptivité au pathogène a mis en évidence l'expression de défenses à différents moments du cycle infectieux.

Les cires cuticulaires constituent la première barrière physico-chimique rencontrée par la conidie, unité d'infection du pathogène. Différentes stratégies d'infection existent chez les microorganismes phytopathogènes. Certains pathogènes appartenant aux genres *Phytophthora* ou *Plasmopara* utilisent des ouvertures naturelles pour pénétrer et coloniser l'hôte. Toutefois, indépendamment du mode de pénétration, le premier élément déterminant le succès d'une infection est lié aux caractéristiques de surface (gradient ionique, courant électrostatique, caractéristiques topographiques). Dans le cas de l'oïdium, le premier contact de la conidie avec la surface de l'hôte comprend une reconnaissance spécifique, qui se traduit par une modification structurale et fonctionnelle du développement du pathogène. Si la nature du signal de contact ne semble pas être topographique, puisque les conidies d'*E. necator* sont capables de germer sur n'importe quels supports inertes, la différenciation en appressorium est étroitement liée à la présence d'une structure cristalline des cires épicuticulaires de l'hôte (Chapitre II). La formation d'appressoria apparaît comme un processus post-germinatif. Une combinaison équilibrée de signaux topographiques et/ou chimiques chez les espèces sensibles, est probablement à l'origine de la formation d'appressoria matures. A l'inverse, *Vitis candicans* présente un motif de cristallisation en assiette, réduisant drastiquement la différenciation des structures infectieuses.

L'activité de certains composés purs extraits des cires cuticulaires a été déterminée après fractionnement chromatographique. Certains ont permis une stimulation ou une inhibition de la formation d'appressoria en fonction des pathosystèmes. Toutefois, pour un

composé donné, les effets peuvent être contrastés en fonction des concentrations, alors que ce même composé est inerte au sein d'un complexe cristallin. La toxicité envers la structure fongique peut être observée si le composé en question est majoritaire dans la composition des cires cuticulaires. Keller *et al.* (2003) a observé qu'une exposition prolongée des feuilles aux UV augmentait la quantité de cires épicuticulaires et, parallèlement, réduisait la sévérité de l'oïdium. L'aspect quantitatif des cires épicuticulaires est à considérer pour l'amélioration variétale par croisement classique ou par génie génétique.

La compréhension simultanée du phénomène de reconnaissance de l'hôte par le pathogène fongique, induisant la différenciation de structures infectieuses spécialisées, et les voies de biosynthèse des composés cireux, permettrait d'envisager de nouvelles perspectives de lutte. En effet, la sélection d'individus exprimant des caractéristiques physico-chimiques de surface défavorables à l'oïdium pourrait constituer une voie d'amélioration de la résistance de *Vitis vinifera*. D'autre part, le blocage de la perception des signaux issus de la plante pourrait être une cible pour l'élaboration de nouveaux fongicides. L'efficacité de l'application d'huile de colza dans la lutte anti-oïdium est vraisemblablement liée à la modification des caractéristiques de surface, inhibant la germination des conidies (Dell *et al.*, 1998).

Chez les champignons biotrophes, la différenciation en appressoria et le processus de pénétration s'accompagnent par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (Lebeda *et al.*, 2001). Les conidies d'*E. necator* possèdent une cutinase pariétale constitutive, rapidement diffusée dans le tube germinatif et dans l'appressorium. La digestion enzymatique du polymère de cutine libère des monomères, dont l'identité n'a pas pu être analysée dans ce travail. Selon les pathosystèmes, les monomères de cutine ont montré des activités ambivalentes, à savoir l'induction des gènes de cutinases fongiques ou l'inhibition de la formation de structures de pénétration. Ainsi, une modification de la composition des acides gras cellulaires par transgénèse menant à un changement du profil des monomères de cutine (Wang *et al.*, 2000), explique l'augmentation de la résistance de la tomate à *Erysiphe polygoni*. Une différence d'activité enzymatique sur la conversion de précurseurs d'acides gras en ces monomères est vraisemblablement à l'origine des modifications observées par Wang *et al.* (2000). Un traitement préventif à base d'une solution enrichie en cutinase fongique pourrait potentiellement accroître les défenses de l'hôte envers une infection.

Heintz (1988) a vérifié si l'absence de cuticule était nécessaire au développement d'*E. necator*, par inoculation de cals. Étonnamment, la sporulation a été observée quelque soit le niveau de résistance du cépage employé pour l'élaboration de cals cambiaux. La présence de photosynthétats dans la cellule infectée semble être l'unique

condition pour l'établissement de l'infection et témoigne des besoins trophiques spécifiques du pathogène. Ce résultat suppose l'existence, au niveau de la paroi cellulaire, de récepteurs permettant la reconnaissance de l'hôte par le pathogène, et confirme la localisation de défense potentielle au niveau de la cuticule.

Une fois la barrière cuticulaire franchie, la structure infectieuse doit pénétrer la paroi pecto-cellulosique pour maintenir l'infection. Les spores de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* produisent trois enzymes impliquées dans la dégradation de la pectine (une hydrolase acide et basique, et une lyase) (Kolattukudy *et al.*, 1989). *E. necator* dispose vraisemblablement de tels outils malgré qu'aucune étude n'ait démontré l'existence d'un tel bagage enzymatique de dégradation de la paroi cellulaire. Cette dernière structure n'a pas été étudiée dans ce travail. Toutefois, des défenses peuvent se manifester par le renforcement de la paroi cellulaire, par l'accumulation de protéines pariétales, de dépôts de callose (polymère de D-glucose) ou de lignine. Tous ces événements peuvent également être à l'origine d'une résistance accrue au pathogène.

La cuticule des plantes ne constitue pas qu'une simple barrière physique à la pénétration de pathogènes. Elle joue un rôle actif dans la reconnaissance de la surface de l'hôte par le pathogène. Inversement, l'altération enzymatique de cette surface couplée à la présence d'effecteurs va permettre la reconnaissance du pathogène par l'hôte. L'identification des structures infectieuses d'*E. necator* induit l'activation de la voie biochimique de la phénylalanine ammonia lyase (PAL), responsable de la synthèse de composés phénoliques, suivie par l'activation de la stilbène synthase, à l'origine de la production de métabolites secondaires présentant des activités fongitoxiques reconnues selon le pathosystème considéré (Hoos et Blauch, 1990). La production importante d' ϵ - et de δ -viniférine au niveau du site infectieux coïncident avec l'arrêt de développement du pathogène, observé sur les hôtes résistants. Ces marqueurs biochimiques constituent une nouvelle voie d'évaluation de la résistance à l'oïdium de la vigne. La nature ectotrophe des oïdiums, de même que la restriction de l'infection à la première assise cellulaire, sont deux paramètres qui obligent à considérer toutes les mesures de composés de défense, en relation avec le nombre de sites de pénétration du pathogène. Par cette méthode fastidieuse, la dilution du signal est évitée mais l'application pour la sélection est limitée.

L'introgession des gènes de la stilbène synthase dans divers organismes végétaux a montré un accroissement du niveau de résistance de ces plantes à diverses maladies fongiques (Jeandet *et al.*, 2002). En outre, la construction de vignes transgéniques par l'implantation d'un promoteur inductible par les agents pathogènes, régulant la stilbène synthase *Vst1* (Coutos-Thévenot *et al.*, 2001) améliore la tolérance vis-à-vis de *B. cinerea*. Une microinjection de chitinase dans les cellules épidermiques infectées de

coléoptiles d'orge provoque une digestion complète de l'haustorium, supprimant le développement ultérieur d'*E. graminis* f. sp. *hordei* (Toyoda et al., 1991). La digestion enzymatique de l'haustorium constitue une stratégie de lutte intéressante, car elle ne cause pas de dommages à la cellule hôte. Cependant, si la technique de transgénèse valide l'effet d'un ou de plusieurs gènes régulant la voie de biosynthèse d'un caractère, le manque de connaissances sur les répercussions environnementales et le pouvoir adaptatif des pathogènes explique le refus actuel de l'opinion public à son application.

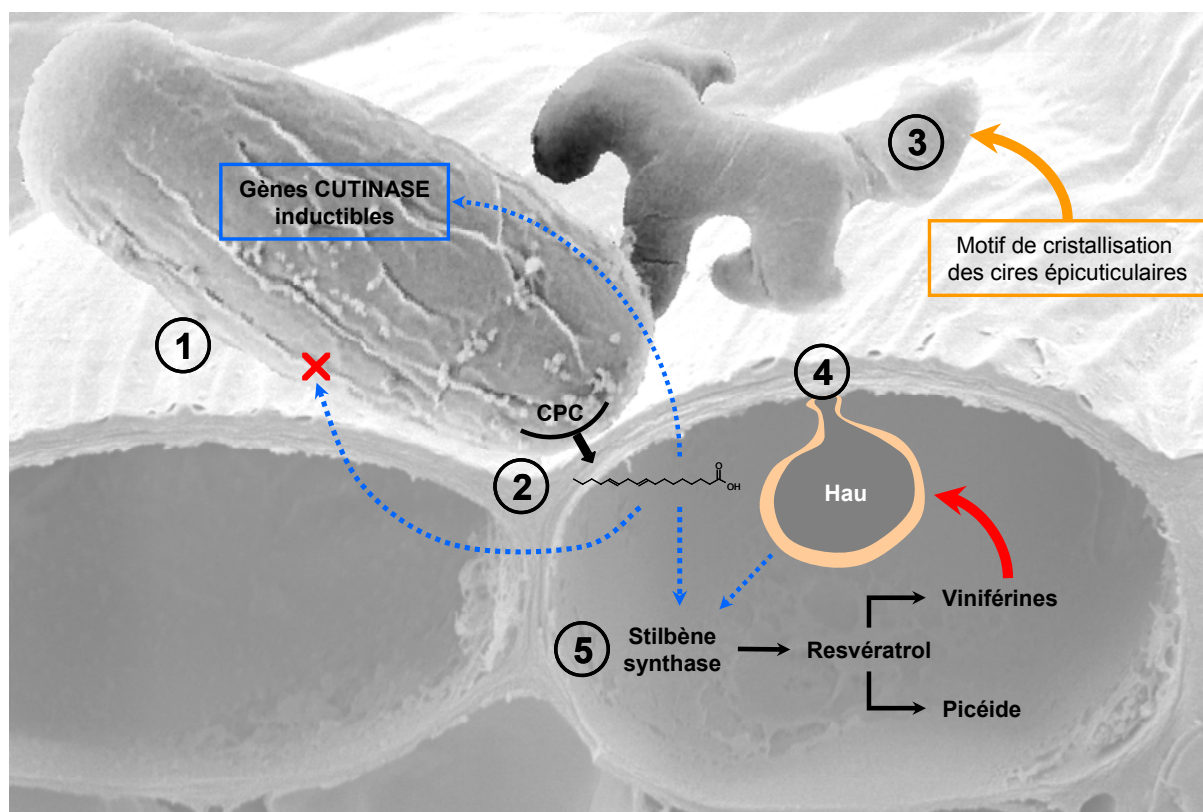


Figure 31 Schéma récapitulatif des premiers événements de l'établissement de l'interaction *E. necator*-*Vitis*. ① Contact de la conidie avec la surface de l'hôte, stimulant l'émergence d'un tube germinatif. ② Hydrolyse d'une faible quantité du polymère de cutine, à partir de la cutinase pariétale constitutive. Les monomères d'acides gras ainsi libérés peuvent induire l'expression massive des gènes de cutinases et autres enzymes nécessaires à la pénétration de l'hôte. ③ L'activation des gènes de cutinases et le signal topographique en provenance de l'apex du tube germinatif, induisent la différenciation en appressorium. Le motif de cristallisation de *V. candidans* est suffisant pour inhiber la différenciation des structures infectieuses et constitue un facteur de résistance. ④ Les cutinases sont libérées au niveau de l'appressorium pour permettre la pénétration de l'hyphe infectieuse. ⑤ L'établissement de l'haustorium induit l'activation des gènes de la stilbène synthase, aboutissant à l'accumulation de resvératrol et de ses dérivés dans la cellule infectée. Les voies indiquées en pointillé restent hypothétiques. CPC: cutinases pariétales constitutives, Hau: haustorium

La chronologie des mécanismes intervenant dans l'établissement de l'interaction *E. necator* - *Vitis* est proposée à la figure 31. Le premier contact de la conidie avec la surface de l'hôte stimule l'émergence d'un tube germinatif. La cutinase constitutive

pariétale localisée au niveau de la conidie mais également du tube germinatif, dégrade une quantité de monomères de cutine suffisante pour induire l'expression de gènes de cutinases fongiques. L'activation des gènes, couplée à la détection de motif de cristallisation des cires épicuticulaires à l'apex du tube germinatif, assurent la différenciation en appressorium. Une excrétion massive de cutinase au niveau de la zone de contact entre appressorium et surface de l'hôte, permet l'hydrolyse finale du polymère de cutine et l'invagination de l'hyphe de pénétration. De façon concomitante, la détection d'effecteurs et la libération de monomères d'acides gras par hydrolyse enzymatique engendrent l'activation de gènes de défense, tels que la stilbène synthase. L'activation d'enzymes oxydantes telles que les peroxydases permettent la transformation du resvératrol en composés fongitoxiques (viniférines), expliquant l'interruption de l'interaction hôte-pathogène. La différence entre espèces sensibles et résistantes peut également s'expliquer par la rapidité d'activation des gènes de la stilbène synthase. Il est envisageable que les espèces résistantes disposent de récepteurs reconnaissant les premiers monomères de cutine, hydrolysés dès le contact entre la conidie et la surface de l'hôte, tandis que les espèces sensibles ne déclenchent les réactions de défenses que lors de la détection de l'hyphe de pénétration. La rapidité de reconnaissance du pathogène, associée à la faculté de synthétiser des viniférines en quantité suffisante, garantissent une inhibition du développement d'*E. necator*.

V. candidans et *E. necator* proviennent de la même aire géographique, soit le sud des Etats-Unis et le nord du Mexique. La spécificité d'*E. necator* suggère une probable co-évolution avec l'hôte, dont la confrontation perpétuelle a obligé le développement constant d'une résistance efficace de l'espèce *V. candidans* (Hückelhoven, 2005). Effectivement, le nombre d'appressoria fonctionnels est restreint par un motif de cristallisation inhibiteur, la formation du premier haustorium est inhibée par l'accumulation massive et rapide de viniférines, avant que le pathogène ne puisse développer un second hyphe qui permettrait une seconde tentative infectieuse dans une cellule épidermique voisine. *V. candidans*, présentant plusieurs caractères de résistance à l'oïdium mis en évidence dans ce travail, constitue un candidat sérieux en tant que géniteur dans un schéma de sélection interspécifique. En effet, l'approche actuelle de la plupart des programmes de recherche en amélioration des plantes cherche à développer des plantes "naturellement" résistantes aux principales maladies par la stratégie de "pyramidage" de gènes de résistance au sein d'une même plante. De ce fait, le contournement de plusieurs mécanismes de résistance simultanés (à déterminisme polygénique) par une simple mutation du pathogène est relativement improbable.

Néanmoins, la durabilité de l'expression d'une résistance multigénique par l'introgession de facteurs génétiques issus de sources de *Vitis* diverses reste à mesurer, tout comme le potentiel adaptatif du pathogène (Jorge *et al.*, 2005). Un niveau de résistance

suffisamment élevé limite la probabilité de contournement de la résistance de la plante par les pathogènes et réduit considérablement l'usage de produits phytosanitaires. En effet, une réponse défensive peut apporter suffisamment de protection pour retarder l'expression des symptômes et augmenter le temps de latence, voire idéalement, inhiber complètement le pathogène.

Aujourd'hui, plusieurs voies de recherche tentent de solutionner la problématique de l'emploi répété de produits phytosanitaires. D'une part, la compréhension des facteurs déclenchant les inoculations primaires permet de mieux cibler les premières applications et gérer la pression de maladie sur la saison. D'autre part, l'aérobiologie basée sur la détection du pathogène selon l'amplification par PCR à partir d'une ou plusieurs spores fongiques, constitue une nouvelle approche d'utilisation des pièges à spores, afin d'évaluer la pression d'inoculum dans l'air et déterminer le moment opportun d'application de fongicides. Les modèles de prévision des risques de maladies intègrent l'ensemble de ces paramètres et constitue une aide à la décision pour le praticien. Toutefois, malgré une meilleure prédiction du positionnement de traitement mais sans pouvoir en restreindre le nombre car étroitement dépendant de la pression de la maladie, ainsi que l'apparition de résistance à certaines molécules fongicides au sein des populations de pathogènes, génèrent des résultats limités en réalité. Glawe (2008) suggère que les changements climatiques pourront être à l'origine de bouleversements de la dynamique des populations d'oïdiums, dont les conséquences sur les plantes-hôtes restent pour le moment inconnues.

L'amélioration variétale reste la voie la plus prometteuse dans l'optique d'une production de qualité, respectueuse de l'environnement. Cette approche nécessite le développement de la sélection assistée par marqueurs (biochimiques et moléculaires) et notamment la construction de géniteurs. L'accumulation de gènes de résistance complémentaires via l'introgession de sources multiples de résistance au sein d'un fond génétique de *V. vinifera* est la garantie d'une manifestation durable de la résistance. En d'autres termes, il s'agit de compléter les gènes de résistance originels d'un cultivar avec d'autres gènes de résistance, dans le respect des exigences vitivinicoles. Au sein de populations issues de croisement entre le géniteur résistant et le parent *V. vinifera* récurrent, la présence de l'allèle du locus contrôlant le caractère de résistance est déterminé par un criblage précoce par PCR, évitant l'étape d'évaluation phénotypique (infections artificielles) nécessitant une standardisation de la physiologie des individus et des conditions d'infection. Les espèces chinoises de *Vitis* apparaissent plus compatibles au croisement avec *V. vinifera*, car elles disposent d'un bon réservoir de résistance sans exprimer le goût foxé indésirable des espèces américaines (Wang *et al.*, 1995). Toutefois, les caractères non désirés peuvent également faire l'objet d'un marquage, afin

d'éliminer les individus non conformes aux souhaits du sélectionneur. De même, l'identification de régions génomiques liées aux caractères de résistance à l'oïdium devrait permettre de suivre les gènes d'intérêt dans les générations successives, tester leur corrélation à la résistance dans différents fonds génétiques, supports à l'innovation variétale.

D'un point de vue fondamental, la détection de QTL constitue le préambule du clonage positionnel des régions génomiques d'intérêt pour déterminer les gènes impliqués dans les mécanismes de résistance et pour mieux comprendre les voies biochimiques impliquées au niveau cellulaire dans la résistance à *E. necator*. Le développement de marqueurs SCAR (*Sequence-characterized amplified regions*) lié à la résistance à l'oïdium constitue également une perspective de recherche. Les microsatellites nécessitent une technologie plus sophistiquée, notamment dans la détermination exacte des tailles d'allèles par électrophorèse capillaire. Le développement de marqueur de type SCAR a l'avantage d'être facilement mesurable (gel d'agarose) et envisage un screening rapide d'un nombre important de génotypes au sein d'un schéma de sélection (Akkurt *et al.*, 2007).

Les programmes de sélection nécessitent des marqueurs fiables, reproductifs, facilement réalisables et exploitables. L'analyse qualitative et quantitative des stilbènes durant le processus infectieux d'*E. necator* s'est révélée étroitement corrélée au niveau de résistance des hybrides obtenus par croisement interspécifique. La recherche de nouveaux marqueurs passe par un approfondissement des connaissances de l'interaction hôte-pathogène, afin de contribuer à une sélection rapide des génotypes résistants.

La haute valeur ajoutée des produits vinicoles fait que l'intégration d'évolutions scientifiques et techniques dans la gestion de la production peut apporter d'importants avantages compétitifs; et laisse entrevoir des perspectives d'innovations variétales intégratives dans le schéma de sélection viticole actuel. Cependant, le respect de l'authenticité et la typicité des produits reste une exigence de la profession, plus dans une optique d'argumentaire commercial que par rapport aux attentes réelles des consommateurs. Les avancées en matière de gestion d'intrants et de respect de l'écosystème du vignoble restent cependant indéniables; "*le jus de la vigne clarifiant l'esprit et l'entendement des derniers sceptiques*" (modifié d'après François Rabelais).

Références Bibliographiques

- Adam-Blondon AF, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D, This P. Mapping of 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. **Theoretical and Applied Genetics** 2004; 109: 1017-1027.
- Adrian M, Jeandet P, Veneau J, Weston LA, Bessis R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. **Journal of Chemical Ecology** 1997; 23(7): 1689-1702.
- Ahmed A, Crawford T, Gould S, Ha YS, Hollrah M, Noor-E-Ain F, Dickman MB, Dussault PH. Synthesis of (R)- and (S)-10,16-dihydroxyhexadecanoic acid: cutin stereochemistry and fungal activation. **Phytochemistry** 2003; 63: 47-52.
- Akkurt M, Welter L, Maul E, Töpfer R, Zyprian EM. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). **Molecular Breeding** 2007; 19: 103-111.
- Annis SL, Goodwin PH. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology** 1997; 103(1): 1-14.
- Arnaud G, Arnaud M. Traité de pathologie végétale. Tome 1, vol. 1, Lechevalier, Paris 1931; 281-318.
- Baker CJ, Bateman DF. Cutin degradation by plant pathogenic fungi. **Journal of Physiology and Biochemistry** 1978; 68: 1577-1584.
- Baker EA. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In Cutler DF, Alvin KL, Price CE, eds, The Plant Cuticle. Linnean Society Symposium Series, Vol 10. Academic Press, London 1982; 139-165.
- Baldi I, Lebaillly P. Cancers and Pesticides. **La revue du Praticien** 2007; 57(11): 40-44.
- Barker CL, Donald T, Pauquet J, Ratnaparkhe MB, Bouquet A, Adam-Blondon AF, Thomas MR, Dry IB. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. **Theoretical and Applied Genetics** 2005; 111: 370-377.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelm H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society** 1998; 126: 237-260.
- Bélanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, eds. The powdery mildews: a comprehensive treatise. St Paul: APS Press 2002; 292 p.
- Belhadj A, Saigne C, Telef N, Cluzet S, Bouscaut J, Corio-Costet MF, Mérillon JM. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2006; 54(24): 9119-9125.
- Bianchi G, Lupotto E, Corbellini M. Composition of epicuticular waxes of *Triticum aestivum* Demar-4 from different parts of the plant. **Agrochimica** 1980; 23(2):96-102.
- Bjørling-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environmental Health** 2008; 7(1): 50.

- Bolay, A. (2005). Les oïdiums de Suisse (Erysiphacées). **Cryptogamica Helvetica** 2005; 20: 1-176.
- Boubals D. Etude des causes de la résistance des vitacées à l'oïdium de la vigne *Uncinula necator* (Schw.) Burr. et de leur mode de transmission héréditaire. **Ann. Amélior. Plant** 1961; 11: 401-500.
- Bouquet A. Introduction dans l'espèce *Vitis vinifera* L. d'un caractère de résistance à l'oïdium (*Uncinula necator* Schw. Burr.) issu de l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. **Vigne-Vini** 1986; 12(Suppl.): 141-146.
- Bowers JE, Dangl GS, Vignani R, Meredith CP. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome** 1996; 39: 628-633.
- Braun U, Takamatsu S. Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (Erysipheae) and *Cytotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystothecaceae) inferred from rDNA ITS sequences – some taxonomic consequences. **Schlechtendalia** 2000; 4: 1-33.
- Brem S, Rast DM, Ruffner HP. Partitioning of photosynthetate in leaves of *Vitis vinifera* infected with *Uncinula necator* and *Plasmopara viticola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1986; 29: 285-291.
- Brown MV, Moore JN, McNew RW, Fenn P. Inheritance of downy mildew resistance in table grapes. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 1999; 124(3): 262-267.
- Buschhaus C, Herz H, Jetter R. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. **New Phytologist** 2007; 176: 311-316.
- Buschhaus C, Herz H, Jetter R. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. **Annals of Botany** 2007; 100: 1557-1564.
- Calonnec A, Cartolaro P, Naulin JM, Bailey D, Langlais M. A host-pathogen simulation model: powdery mildew of grapevine. **Plant Pathology** 2008; 57: 493-508.
- Calonnec A, Cartolaro P, Poupot C, Dubourdieu D, Darriet P. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. **Plant Pathology** 2004; 53: 434-445.
- Calonnec A, Latu G, Naulin JM, Roman J, Tessier G. Parallel simulation of the propagation of powdery mildew in a vineyard. **Computer Science** 2005; 3648: 1254-1264.
- Carroll JE, Wilcox WF. Effect of humidity on the development of grapevine powdery mildew. **Phytopathology** 2003; 93: 1137-1144.
- Cartolaro P, Steva H. Maîtrise de l'oïdium au laboratoire. **Phytoma** 1990; 419: 37-40.
- Carver TLW, Ingerson-Morris SM, Thomas BJ. Influences of host surface features on development of *Erysiphe graminis* and *Erysiphe pisi*. In: Plant cuticles – An integrated functional approach. G. Kerstiens ed. BIOS Scientific Publishers, Oxford 1996; 255-266.

- Carver TLW, Ingerson-Morris SM. Responses of *Erysiphe graminis* germings to contact with artificial and host surfaces. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1987; 30: 359-372.
- Carver TLW, Kunoh H, Thomas BJ, Nicholson RL. Release and visualization of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. **Mycological Research** 1999; 103: 547-560.
- Carver TLW, Thomas BJ, Ingerson-Morris SM, Roderick HW. The role of abaxial leaf surface waxes of *Lolium* spp. in resistance to *Erysiphe graminis*. **Plant Pathology** 1990; 39: 573-583.
- Carver TLW, Thomas BJ, Ingerson-Morris SM. Low temperature scanning electron microscopy of the surface of *Erysiphe graminis* DC and the production of extracellular material at the fungus:host interface during germling and colony development. **Canadian Journal of Botany** 1995; 73: 272-287.
- Casado CG, Heredia A. Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). **Journal of Experimental Botany** 1999; 50(331): 175-182.
- Chassot C, Métraux JP. The cuticle as source of signals for plant defense. **Plant Biosystems** 2005; 139(1): 28-31.
- Chellemi DO, Marois JJ. Development of a demographic growth model for *Uncinula necator* by using a microcomputer spreadsheet program. **Phytopathology** 1991; 81(3): 250-254.
- Comménil P, Belingheri L, Audran JC, Collas A, Dehorter B. Mise en évidence d'une activité anti-*Botrytis* dans les cires épicuticulaires de jeunes baies de *Vitis vinifera*, variété Pinot Noir. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin** 1996; 30(1): 7-13.
- Corio-Costet MF. *Erysiphe necator*. Monographies de microbiologie. Editions Ted et Doc / Lavoisier / EM inter 2007; 136 p.
- Coutos-Thevenot P, Poinssot B, Bonomelli A, Yean H, Breda C, Buffard D, Esnault R, Hain R, Boulay M. In vitro tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. **Journal of Experimental Botany** 2001; 52(358): 901-910.
- Crisp P, Wicks TJ, Troup G, Scott ES. Mode of action of milk and whey in the control of grapevine powdery mildew. **Australian Plant Pathology** 2006; 35: 487-493.
- Dalbó MA, Ye GN, Weeden NF, Wilcox WF, Reisch BI. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 2001; 126(1): 83-89.
- Darriet P, Pons M, Henry R, Dumont O, Findeling V, Cartolaro P, Calonnec A, Dubourdieu D. Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2002; 50: 3277-3282.
- De Vienne D. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA Edition 1998; 195 p.

- Deising H, Nicholson RL, Haug M, Howard RJ, Mendgen K. Adhesion pad formation and the involvement of cutinases and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. **The Plant Cell** 1992; 4: 1101-1111.
- Dell KJ, Gubler WD, Krueger R, Sanger M, Bettiga LJ. The efficacy of JMS Stylet-Oil on grape powdery mildew and Botrytis bunch rot and effects on fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture** 1998; 49(1): 11-16.
- Delp CJ. Effect of temperature and humidity on the grape powdery mildew fungus. **Phytopathology** 1954; 44(11): 615-626.
- Dercks W, Creasy LL. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola* - grapevine interaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1989;34: 189-202.
- Di Gaspero G, Cipriani G, Adam-Blondon AF, Testolin R. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. **Theoretical and Applied Genetics** 2007; 114(7): 1249-1263.
- Di Gaspero G, Cipriani G. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). **Theoretical and Applied Genetics** 2002; 106: 163-172.
- Doliguez A, Adam-Blondon AF, Cipriani G, Di Gaspero G, Laucou V, Merdinoglu D, Meredith CP, Riaz S, Roux C, This P. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. **Theoretical and Applied Genetics** 2006; 113: 369-382.
- Dominguez E, Heredia A. Waxes: a forgotten topic in lipid teaching. **Biochemical Education** 1998; 26: 315-316.
- Donald TM, Pellerone F, Adam-Blondon AF, Bouquet A, Thomas MR, Dry IB. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** 2002; 104: 610-618.
- Doss RP, Potter SW, Soeldner AH, Christian JK, Fukunuga LE. Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology** 1995; 61(1): 260-265.
- Doster MA, Schnathorst WC. Comparative susceptibility of various grapevine cultivars to the powdery mildew fungus on grapes. **American Journal of Enology and Viticulture** 1985b; 36: 101-104.
- Doster MA, Schnathorst WC. Effects of leaf maturity and cultivar resistance on development of the powdery mildew fungus on grapevines. **Phytopathology** 1985a; 75: 318-321.
- Edwards HH, Allen PJ. A fine structure study of the primary infection process of barley infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Phytopathology** 1970; 60: 1504-1509.
- Ehrlich MA, Ehrlich HG. Fine structure of the host-parasite interfaces in mycoparasitism. **Annual Review of Phytopathology** 1971; 9: 155-184.
- Eibach R. Investigations about the genetic resources of grapes with regard to resistance characteristics to powdery mildew (*Oidium tuckeri*). **Vitis** 1994; 33: 143-150

Eigenbrode SD, Espelie KE, Shelton AM. Behavior of neonate diamondback moth larvae (*Plutella xylostella* (L.)) on leaves and on extracted leaf waxes of resistant and susceptible cabbages. **Journal of Chemical Ecology** 1991; 17(8):1691-1704.

Eilbert F, Thines E, Sterner O, Anke H, Fatty acids and their derivatives as modulators of appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 1999, 63(5): 579-583.

Emmett RW, Parbery DG. Appressoria. **Annual Review of Phytopathology** 1975;13: 147-167.

Erickson EO, Wilcox WF. Distribution of sensitivities to three sterol demethylation inhibitor fungicides among populations of *Uncinula necator* sensitive and resistant to triadimefon. **Phytopathology** 1997; 87: 784-791.

FAO, COMPENDIUM OF FOOD ADDITIVE SPECIFICATIONS - Addendum 7 - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 53rd session - Rome, 1-10 June 1999; http://www.fao.org/docrep/X3860E/X3860E20.htm#P5107_110391.

Fauth M, Schweizer P, Buchala A, Markstadter C, Riederer M, Kato T, Kauss H. Cutin monomers and surface wax constituents elicit H₂O₂ in conditioned cucumber hypocotyls segments and enhance the activity of other H₂O₂ elicitors. **Plant Physiology** 1998; 117: 1373-1380.

Felle HH, Herrmann A, Hanstein S, Hüchelhoven R, Kogel KH. Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. **Molecular Plant Microbe Interaction** 2004; 17(1): 118-123.

Fischer BM, Salakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Töpfer R, Zyprian EM. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. **Theoretical and Applied Genetics** 2004; 108: 501-515.

Francis S, Dewey M, Gurr SJ. The role of cutinase in germling development in *Erysiphe graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1996; 49: 201-211.

Frič F, Wolf G. Hydrolytic enzymes of ungerminated and germinated conidia of *Erysiphe graminis* DC f. sp. *hordei* Marchal. **Journal of Phytopathology** 1994; 140(1): 1-10.

Fung RW, Gonzalo M, Fekete C, Kovacs LG, He Y, Marsh E et al. Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. **Plant Physiology** 2008; 146(1): 236-249.

Gabler FM, Smilanick JL, Mansour M, Ramming DW, Mackey BE. Correlations of morphological anatomical and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. **Phytopathology** 2003; 93(10): 1263-1273.

Gadoury DM, Seem RC, Pearson RC, Wicox WF. Effects of powdery mildew on vine growth, yield, and quality of Concord Grapes. **Plant Disease** 2001; 85(2): 137-140.

Galet P. 1977. Les maladies cryptogamiques: Oïdium. Dans Les maladies et parasites de la vigne. I. Les maladies dues à des végétaux, 15-88. Imprimerie du Paysan du Midi, Montpellier.

Galet P. Précis de viticulture. Editions P. Galet 2000; 602 p.

Gallais A. La sélection assistée par marqueurs. In: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. Aupelf-Uref. John Libbey Eurotext. Paris 1994; 387-397.

- Garcia S, Garcia C, Heinzen H, Moyna P, Chemical basis of the resistance of barley seeds to pathogenic fungi. **Phytochemistry** 1997; 44 (3): 415-418.
- Gérard HC, Fett WF, Moreau RA, Osman SF, Miller RL. Chemical and enzymatic investigation of the leaf cuticle of pear genotypes differing in resistance to pear Psylla. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 1993; 41: 2437-2441.
- Gevens A, Nicholson RL. In this issue "Cutin composition: A subtle role for fungal cutinase?". **Physiological and Molecular Plant Pathology** 2000; 57: 43-45.
- Gilbert RD, Johnson AM, Dean RA. Chemicals signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1996; 48: 335-346.
- Gindro K, Pezet R. Evidence for cytoplasmic cutinase in ungerminated conidia of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. **FEMS Microbiology Letters** 1997; 149: 89-92.
- Gindro K, Spring JL, Pezet R, Richter H, Viret O. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. **Vitis** 2006; 45(4): 191-196.
- Gniwotta F, Vogg G, Gartmann V, Carver TLW, Riederer M, Jetter R. What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cultivar waxes. **Plant Physiology** 2005; 139: 519-530.
- Gow NAR. Nonchemical signals used for host location and invasion by fungal pathogens. **Trends in Microbiology** 1993; 1(2): 45-50.
- Grando MS, Bellin D, Edwards KJ, Pozzi C, Stefanini M, Velasco R. Molecular linkage maps of *Vitis vinifera* L. and *Vitis riparia* Mchx. **Theoretical and Applied Genetics** 2003: 106: 1213-1224.
- Green JR, Carver TLW, Gurr SJ. The formation and function of infection and feeding structures. In: Belanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW. eds. The Powdery Mildews. A comprehensive Treatise. American Phytopathological Society, Minnesota USA, 2002; 66-82.
- Green JR, Pain NA, Cannell ME, Jones GL, Leckie CP, McCreedy S, Mendgen K, Mitchell AJ, Callow JA, O'Connell RJ. Analysis of differentiation and development of the specialised infection structures formed by biotrophic fungal plant pathogens using monoclonal antibodies. **Canadian Journal of Botany** 1995; 73: 403-417.
- Gubler WD, Rademacher M, Vasquez SJ, Thomas CS. Control of powdery mildew using the UC Davis powdery mildew risk index. **American Phytopathological Society (APS)** 1999; <http://www.aspnnet.org:online:feature:pmildew:top.html>.
- Gubler WD, Ypema HL, Ouimette DG, Bettiga LJ. Occurrence of resistance in *Uncinula necator* to triadimenol, myclobutanil, and fenarimol in California grapevines. **Plant Disease** 1996; 80: 902-909.
- Hain R, Reif HJ, Krause E, Langebartels R, Kindl H, Vornam B, Wiese W, Schmelzer E, Schreier PH, Stöcker RH, Stenzel K. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. **Nature** 1993; 361: 153-156.
- Hajlaoui MR, Benhamou N, Belanger RR. Cytochemical aspects of fungal penetration, haustorium formation and interfacial material in rose leaves infected by *Sphaerotheca*

- pannosa* var. *rosae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1991; 39: 341-355.
- Hallam ND, Chambers TC. Leaf waxes of genus *Eucalyptus* L'Heritier. **Australian Journal of Botany** 1970; 18(3): 335.
- Hamer JE, Howard RJ, Chumley FG, Valent B. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science** 1988; 239(4837): 288-290.
- Hammerschmidt R. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology** 1999; 37: 285-306.
- Hargreaves JA, Brown GA, Holloway PJ. The structural and chemical characteristics of the leaf surface of *Lupus Albus* L. in relation to the distribution of antifungal compounds. In: Cutler DF, Alvin KL, Price CE, eds. The plant cuticle. Linnean Society Symposium Series, Vol 10. Academic Press: London 1982; 331-340.
- Hayes MA. Identification of host genes involved in the biotrophic interaction between grapevine and powdery mildew. PhD dissertation, University of Adelaide, Australia, 2006; 184 p.
- Hedge Y, Kolattukudy PE. Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1997; 51: 75-84.
- Heintz C, Blaich R. Ultrastructural and histochemical studies on interrelations between *Vitis* and *Uncinula necator*. **New Phytologist** 1990; 115: 107-117.
- Heintz C. Etude du processus d'infection de la vigne par l'oïdium et des mécanismes de défense chez différents cépages. PhD dissertation, Université de Bordeaux II, France, 1988; 182 p.
- Hoos G, Blaich R. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. **Journal of Phytopathology** 1990; 129(2): 102-110.
- Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH, Money NP. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. **Proceedings of the National Academy of Science of USA** 1991; 88(24): 11281-4.
- Hückelhoven R. Cell wall – associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annual Review of Phytopathology** 2007; 45: 101-127.
- Hückelhoven R. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. **FEMS Microbiology Letters** 2005; 245: 9-17.
- Huggins C, Lapides J. Chromogenic substrates. IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase. **Journal of Biochemical Chemistry** 1947; 170: 467-482.
- Huglin P. Biologie et écologie de la vigne. Editions Tec et Doc 1986; 372 p.
- Inyang EN, Butt TM, Beckett A, Archer S. The effect of crucifer epicuticular waxes and leaf extracts on the germination and virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Mycological Research** 1999; 103(4): 419-426.

Jacobs AK, Dry IB, Robinson SP. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. **Plant Pathology** 1999; 48: 325-336.

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P; French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. **Nature** 2007; 449(7161): 463-467.

Jang MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science** 1997; 275(5297): 218-220.

Jeandet P, Douillt-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2002; 50(10): 2731-2741.

Jeffree CE. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G, eds, Plant cuticles. An integrated functional approach. Bios Scientific Publishers, Oxford 1996; 33-82.

Jeffree CE. The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. In: Insects and the plant surface. Juniper B and Southwood R, eds, Edward Arnold, London 1986; 23-64.

Jenks MA, Ashworth EN. Plant epicuticular waxes: functions, productions and genetics. **Horticultural Reviews** 1999; 23: 1-67.

Jenks MA, Gaston CH, Goodwin MS, Keith JA, Teusink RS, Wood KV. Seasonal variation in cuticular waxes on *Hosta* genotypes differing in leaf surface glaucousness. **HortScience** 2002; 37(4): 673-677.

Jetter R, Kunst L. Plant surface lipid biosynthetic pathways and their utility for metabolic engineering of waxes and hydrocarbon biofuels. **The Plant Journal** 2008; 54: 670-683.

Jetter R, Kunst L, Samuels AL. Composition of plant cuticular waxes. In: Biology of the plant cuticle (Riederer M, Müller C, eds). Oxford: Blackwell Publishing 2006; 145-181.

Jetter R, Schäffer S, Riederer M. Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. **Plant, Cell and Environment** 2000; 23: 619-628.

Jetter R, Schäffer S. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. **Plant Physiology** 2001; 126: 1725-1737.

Jones EBG. Fungal adhesion. **Mycological Research** 1994; 98: 961-981.

Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. **Nature** 2006; 444: 323-329.

- Jorge V, Dowkiw A, Faivre-Rampant P, Bastien C. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. **New Phytologist** 2005; 167: 113-127.
- Keller M, Rogiers SY, Schultz HR. Nitrogen and ultraviolet radiation modify grapevines' susceptibility to powdery mildew. **Vitis** 2003; 42(2): 87-94.
- Knogge, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell** 1996; 8:1711-1722.
- Koch K, Neinhuis C, Ensikat HJ, Barthlott W. Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM). **Journal of Experimental Botany** 2004; 55(397): 711-718.
- Koh S, Somerville S. Show and Tell: cell biology of pathogen invasion. **Current Opinion in Plant Biology** 2006; 9: 406-413.
- Kolattukudy PE, Li D, Hwang C-S, Flaishman MA. Host signals in fungal gene expression involved in penetration into the host. **Canadian Journal of Botany** 1995; 73 (Suppl.1): S1160-S1168.
- Kolattukudy PE, Purdy RE, Maiti IB. Cutinases from fungi and pollen. **Methods in Enzymology** 1981; 71c: 652-664.
- Kolattukudy PE, Rogers LM, Li D, Hwang CS, Flaishman MA. Surface signaling in pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 1995; 92: 4080-4087.
- Kolattukudy PE. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 1985; 23: 223-250.
- Kollattukudy PE, Podila GK, Mohan R. Molecular basis of the early events in plant-fungus interaction. **Genome** 1989; 31: 342-349.
- Koller W, Parker DM, Becker CM. Role of cutinase in the penetration of apples leaves by *Venturia inaequalis*. **Journal of Physiology and Biochemistry** 1991; 81(11): 1375-1379.
- Krisa S, Larronde F, Budzinski H, Decendit A, Deffieux G, Merillon JM. Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures : Methyljasmonate induction and ¹³C labelling. **Journal of Natural Products** 1999; 62: 1688-1690.
- Kunoh H, Nicholson RL, Yosioka H, Yamaoka N, Kobayashi I. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*: degradation of the host cuticle. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1990; 36: 397-407.
- Kunst L, Jetter R, Samuels, AL. Biosynthesis and transport of plant cuticular waxes. In: Biology of the plant cuticle (Riederer M, Müller C, eds). Oxford: Blackwell Publishing 2006; 182-215.
- Lakso AN, Pratt C, Pearson RC, Pool RM, Seem RC, Welser MJ. Photosynthesis, transpiration, and water use efficiency of mature grape leaves infected with *Uncinula necator* (powdery mildew). **Phytopathology** 1982; 72: 232-236.
- Lander ES, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 1989; 121: 185-199.

- Langcake P, Pryce RJ. Production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology** 1976; 9(1): 77-86.
- Langcake P. Disease resistance of *Vitis* spp and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene. **Physiological Plant Pathology** 1981; 18(2): 213-226.
- Lebeda A, Luhová L, Sedlářová M, Jančová D. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. **Journal of Plant Diseases and Protection** 2001; 108(1): 89-111.
- Leckband G, Lörz H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. **Theoretical and Applied Genetics** 1998; 96(8): 1004-1012.
- Leinhos GME, Gold RE, Düggelin M, Guggenheim R. Development and morphology of *Uncinula necator* following treatment with the fungicides kresoxim-methyl and penconazole. **Mycological Research** 1997; 101: 1033-1046.
- Li H. Studies on the resistance of grapevine to powdery mildew. **Plant Pathology** 1993; 42: 792-796.
- Liang H, Zheng J, Duan X, Sheng B, Jia S, Wang D, Ouyang J, Li J, Li L, Tian W, Hain R, Jia X. A transgenic wheat with a stilbene synthase gene resistant to powdery mildew obtained by biolistic method. **Chinese Science Bulletin** 2000; 45(7): 634-638.
- Lyngs Jørgensen HJ, Lyshede OB and Allerup S. Epicuticular wax of the first leaves of two barley cultivars studied by cryo scanning electron microscopy. **Agronomy and Crop Science** 1995; 174: 217-224.
- Marga F, Pesacreta TC, Hasenstein KH. Biochemical analysis of elastic and rigid cuticles of *Cirsum horridulum*. **Planta** 2001; 213(6): 841-848.
- Marois JJ, Nelson JK, Morrison JC, Lile LS, Bledsoe AM. The influence of berry contact within grape clusters on the development of *Botrytis cinerea* and epicuticular wax. **American Journal of Enology and Viticulture** 1986; 37: 293-296.
- Martin B, Hernandez S, Silvarrey C, Anton Jacas J, Cabaleiro C. Vegetable, fish and mineral oils control grapevine powdery mildew. **Phytopathologia Mediterranea** 2005; 44: 169-179.
- Martin JT. Role of cuticle in the defense against plant disease. **Annual Review of Phytopathology** 1964; 2: 81-100.
- Mendgen K, and Naas P. The activity of powdery mildew haustoria after feeding the host cells with different sugars, as measured with a potentiometric cyanine dye. **Planta** 1988; 174: 283-288.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology** 1996; 34: 367-386.
- Mendgen K, Hahn M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science** 2002; 7(8): 352-356.

- Merdinoglu D, Butterlin G, Bevilacqua L, Chiquet V, Adam-Blondon AF, Decroocq S. Development and characterization of a large set of microsatellite markers in grapevine (*Vitis vinifera* L.) suitable for multiplex PCR. **Molecular Breeding** 2005; 15: 349-366.
- Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, Butterlin G, Greif C. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. **Acta Horticulturae** 2003; 603: 451-456.
- Nawrath C. The biopolymers cutin and suberin. The Arabidopsis book 2002; 1-14.
- Nicholson RL, Vanscoyo S, Kuc J, Williams EB. Response of detached apple leaves to *Venturia inaequalis*. **Phytopathology** 1973; 63(5): 649-650.
- Nicholson RL, Yoshioka H, Yamaoka N. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*. 2. Release of esterase enzyme from conidia in response to a contact stimulus. **Experimental Mycology** 1988; 12(4): 336-349.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Note de conjoncture (mars 2008). http://news.reseau-concept.net/images/oiv/Client/2008_note_conj_mars_FR.pdf.
- Pascholati SF, Deising H, Leite B, Anderson D, Nicholson RL. Cutinase and nonspecific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1993; 42(1): 37-51.
- Pascholati SF, Yoshioka H, Kunoh H, Nicholson R. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*: cutinase is a component of the conidial exudate. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1992; 41: 53-59.
- Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon AF. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics** 2001; 103: 1201-1210.
- Pearson RC, Gadoury DM. Cleistothecia, the source of primary inoculum for grape powdery mildew in New York. **Phytopathology** 1987; 77(11): 1509-1514.
- Pearson RC, Gärtel W. Occurrence of hyphae of *Uncinula necator* in buds of grapevine. **Plant Disease** 1984; 69(2): 149-151.
- Perfect SE, Green JR. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology** 2001; 2: 101-108.
- Pezet R, Bolay A. L'oïdium de la vigne: situation actuelle et conséquences pour la lutte. **Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture** 1992; 24: 67-71.
- Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. **Vitis** 2004a; 43(3): 145-148.
- Pezet R, Gindro K, Viret O, Spring JL. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 2004b; 65(6): 297-303.
- Pezet R, Perret C, Jean-Denis JB, Tabacchi R, Gindro K, Viret O. Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2003; 51(18): 5488-5492.

- Pezet R, Pont V. Identification of pterostilbene in grape berries of *Vitis vinifera*. **Plant Physiology and Biochemistry** 1988; 26(5): 603-607.
- Pezet R, Pont V. Mode of toxic action of Vitaceae stilbenes on fungal cells. In: Daniel M, Purkayastha RP, eds. Handbook of phytoalexins metabolism and action, New York: Marcel Dekker 1995; 317-331.
- Pezet R, Pont V. Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. **Journal of Phytopathology** 1990; 129(1): 19-30.
- Plomion C. Cartographie génétique chez les végétaux et utilisation des cartes de liaison. (2004) <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/cartoqtl/sommaire.html>.
- Podila GK, Rogers LM, Kolattukudy PE. Chemicals signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology** 1993; 103: 267-272.
- Poinssot B, Vandelle E, Bentéjac M, Adrian M, Levis C, Brygoo Y, Garin J, Sicilia F, Coutos-Thévenot P. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. **Molecular Plant Microbe Interaction** 2003; 16(6): 553-564.
- Pool RM, Pearson RC, Welser MJ, Lasko AN, Seem RC. Influences of powdery mildew on yield and growth of rosette grapevines. **Plant Disease** 1984; 68: 590-593.
- Possingham JV, Chambers TC, Radler F, Grncarevic M. Cuticular transpiration and wax structure composition of leaves and fruit of *Vitis vinifera*. **Australian Journal of Biological Science** 1967; 20: 1149-1153.
- Pryce-Jones E, Carver TC, Gurr SJ. The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1999; 55: 273-279.
- Purdy RE, Kolattukudy PE. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Properties of cutinase I, cutinase II and a nonspecific esterase isolated from *Fusarium solani pisi*. **Biochemistry** 1975; 14(13): 2832-2840.
- Radler F. The surface waxes of the Sultana vine (*Vitis vinifera* cv. Thompson seedless). **Australian Journal of Biological Science** 1965; 18: 1045-1056.
- Rao MN, Siegel MR, Wiglesworth M. The role of duvatriene-diols in the susceptibility of burley tobacco to *Peronospora tabacina*. **Phytopathology** 1987; 77(12): 1723-23.
- Reisige K, Gorzelanny C, Daniels U, Moerschbacher BM. The C28 aldehyde octacosanal is a morphogenetically active component involved in host plant recognition and infection structure differentiation in the wheat stem rust fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 2006; 68: 33-40.
- Reynolds E. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 1963; 17: 208-212.
- Richter H, Pezet R, Viret O, Gindro K. Characterization of 3 new partial stilbene synthase genes out of over 20 expressed in *Vitis vinifera* during the interaction with *Plasmopara viticola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 2005; 67: 248-260.

- Riedel M, Eichner A, Jetter R. Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. **Planta** 2003; 218: 87-97.
- Riederer M, Müller C. Biology of the plant cuticle. Oxford: Blackwell Publishing 2006; 463p.
- Romero-Perez AI, Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C, de la Torre-Boronat MC. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2001; 49(1): 210-215.
- Rügner A, Rumbolz J, Huber B, Bleyer G, Gisi U, Kassemeyer HH, Guggenheim R. Formation of overwintering structures of *Uncinula necator* and colonization of grapevine under field conditions. **Plant Pathology** 2002; 51: 322-330.
- Rumbolz J, Kassemeyer HH, Steinmetz V, Deising HB, Mendgen K, Mathys D, Wirtz S, Guggenheim R. Differentiation of infection structures of the powdery mildew fungus *Uncinula necator* and adhesion to the host cuticle. **Canadian Journal of Botany** 2000; 78: 409-421.
- Saccardo Syllage Fungorum, volume I, p. 22
<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=149735>.
- Salinas J, Warnaar F, Verhoeff K. Production of cutin hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea* in vitro. **Journal of Phytopathology** 1986; 116: 299-307.
- Sall MA, Wrynski J. Perennation of powdery mildew in buds of grapevines. **Plant Disease** 1982; 66(8): 678-679.
- Sall MA. Epidemiology of grape powdery mildew: a model. **Phytopathology** 1980; 70(4): 338-342.
- Salmaso M, Malacarne G, Troggio M, Faes G, Stefanini M, Grando MS, Velasco R. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic map integrating the position of 139 expressed genes. **Theoretical and Applied Genetics** 2008; 116: 1129-1143.
- Savocchia S, Stummer BE, Wicks TJ, Heeswijck R, Scott ES. Reduced sensitivity of *Uncinula necator* to sterol demethylation inhibiting fungicides in southern Australian vineyards. **Australian Journal of Plant Pathology** 2004; 33: 465-473.
- Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH. Invertase – understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate-metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. **New Phytologist** 1994; 126(2): 213-222.
- Schönherr J, Riederer M. Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. **Plant Cell and Environment** 1986; 9: 459-466.
- Schnee S, Viret O, Gindro K. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 2008; 72: 128-133.
- Schulze-Lefert P, Panstruga R. Establishment of biotrophy by parasitic fungi reprogramming of host cells for disease resistance. **Annual Review of Phytopathology** 2003; 41: 641-667.
- Schweizer P, Felix G, Buchala A, Müller C, Métraux JP. Perception of free cutin monomers by plant cells. **The Plant Journal** 1996a; 10(2): 331-341.

- Schweizer P, Jeanguenat A, Whitacre D, Métraux JP, Mosinger E. Induction of resistance in barley against *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* by free cutin monomers. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 1996b; 49: 103-120.
- Seiffert U, Schweitzer P. A pattern recognition tool for quantitative analysis of *in planta* hyphal growth of powdery mildew fungi. *Molecular Plant-Microbes Interactions* 2005; 18(9): 906-912.
- Shrimpton AE, Robertson A. The isolation of polygenic factors controlling bristle score in *Drosophila melanogaster*. II. Distribution of third chromosome bristle effects within chromosome sections. **Genetics** 1988; 11: 445-459.
- Skamnioti P, Gurr SJ. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. **The Plant Cell** 2007; 19: 2674-2689.
- Smith CG. Production of powdery mildew cleistocarps in a controlled environment. **Transactions of the British Mycological Society** 1970; 55: 355-365.
- Smith JA, Blanchette RA, Burnes TA, Gillman JH, David AJ. Epicuticular waxes and white pines blister rust resistance in resistant and susceptible selections of eastern white pine (*Pinus strobes*). **Phytopathology** 2006; 96(2):171-177.
- Staples RC, Grambow HJ, Hoch HC, Wynn W. Contact with membrane grooves induces wheat stem rust uredospore germlings to differentiate appressoria but not vesicles. **Phytopathology** 1983; 73: 1436-1439.
- Staudt G. Evaluation of resistance to grapevine powdery mildew (*Uncinula necator* [Schw.] Burr., anamorph *Oidium tuckeri* Berk.) in accessions of *Vitis* species. **Vitis** 1997; 36(3): 151-154.
- Stein U, Heintz C, Blaich R. The *in vitro* examination of grapevines regarding resistance to powdery and downy mildew. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz** 1985; 92(4): 355-369.
- Steva H, Clerjeau M. Cross-resistance to sterol biosynthesis inhibitors fungicides in strains of *Uncinula necator* isolated in France and Portugal. **Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent** 1990; 55: 983-988.
- Szankowski I, Briviba K, Fleschhut J, Schonherr J, Jacobsen HJ, Kiesecker H. Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). **Plant cell Reports** 2003; 22(2): 141-149.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson L, Dixon RA, Lamb C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA** 1995; 92: 4158-4163.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal** 1997; 11(6): 1187-94.
- Toyoda H, Matsuda Y, Yamaga T, Ikeda S, Morita M, Tamai T, Ouchi S. Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells. **Plant Cell Reports** 1991; 10(5): 217-220.

Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biology** 2005; 7(6): 581-591.

Tsuba M, Katagiri C, Takeuchi Y, Takada Y, Yamaoka N. Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 2002; 60: 51-57.

Tweedy BG, Turner N. Mechanism of sulphur reduction by conidia of *Monlinia fructicola*. **Contributions from Boyce Thompson Institute** 1966; 23(7): 255.

Van Etten JL, Brambl RM. Protein synthesis during fungal spore germination. III. Transfer activity during germination of *Botryodiplodia theobromae* spores. **Phytopathology** 1969; 59: 1894-1902.

Vaz Patto MC, Niks RE. Leaf wax layer may prevent appressorium differentiation but does not influence orientation of the leaf rust fungus *Puccinia hordei* on *Hordeum chilense* leaves. **European Journal of Plant Pathology** 2001; 107: 795-803.

Villena JE, Dominguez E, Heredia A. Monitoring biopolymers presents in plant cuticles by FR-IR spectroscopy. **Journal of Plant Physiology** 2000; 156: 419-422.

Villena JF, Dominguez E, Stewart D, Heredia A. Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. **Planta** 1999; 208: 181-187.

Von Röpenack E, Parr A, Schulze-Lefert P. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. **Journal of Biological Chemistry** 1998; 273(15): 9013-22.

Walton TJ, Kolattukudy PE. Determination of the structures of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. **Biochemistry** 1972; 11(10): 1885-1896.

Wang C, Chin CK, Gianfagna T. Relationship between cutin monomers and tomato resistance to powdery mildew infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 2000; 57: 55-61.

Wang F, Zhang P, Qiang S, Xu LL. Interaction of plant epicuticular waxes and extracellular esterases of *Curvularia eragrostidis* during infection of *Digitaria sanguinalis* and *Festuca Arundinacea* by the Fungus. **International Journal of Molecular Science** 2006; 7: 346-357.

Wang Y, Liu Y, He P, Chen J, Lamikanra O, Lu J. Evaluation of foliar resistance to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* species. **Vitis** 1995; 34(3): 159-164.

Waterhouse AL, Lamuela-Raventós R. The occurrence of Piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. **Phytochemistry** 1994; 37(2): 571-573.

Welter LJ, Göktürk-Baydar, Akkurt M, Maul E, Eibach R, Töpfer R, Zyprian EM. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding** 2007; 20: 359-374.

Wen M, Buschhaus C, Jetter R. Nanotubules on plant surfaces: chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. **Phytochemistry** 2006; 67: 1808-1817.

- Wightwick AM, Mollah MR, Partington DL, Allinson G. Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2008; 56(7): 2457-2464.
- Willoquet L, Berud F, Raoux L, Clerjeau M. Effects of wind, relative humidity, leaf movement and colony age on dispersal of conidia of *Uncinula necator*, causal agent of grape powdery mildew. **Plant Pathology** 1998; 47: 234-242.
- Willoquet L, Colombet D, Rougier M, Fargues J, Clerjeau M. Effects of radiation, especially ultraviolet B, on conidial germination and mycelial growth of grape powdery mildew. **European Journal of Plant Pathology** 1996; 102: 441-449.
- Woloshuk CP, Kolattukudy PE. Mechanism by which contact with plant cuticle triggers cutinase gene-expression in the spores of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 1986; 83(6): 1704-1708.
- Yang G, Espelie KE, Todd JW, Culbreath AK, Pittman RN, Demski JW. Cuticular lipids from wild and cultivated peanuts and the relative resistance of these peanut species to fall armyworm and thrips. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 1993; 41: 814-816.
- Yang SL, Ellingbo AH. Cuticle layer as a determining factor for formation of mature appressoria of *Erysiphe graminis* on wheat and barley. **Phytopathology** 1972; 62(7): 708-714.
- Zabka V, Stangl M, Bringmann G, Vogg G, Riederer M, Hildebrandt U. Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus. **New Phytologist** 2008; 177: 251-263.
- Zeyen RJ, Bushnell WR. Papilla response of barley epidermal cells caused by *Erysiphe graminis*: Rate and method of deposition determined by microcinematography and transmission microscopy. **Canadian Journal of Botany** 1979; 57: 898-913.
- Zhu YJ, Agbayani R, Jackson MC, Tang CS, Moore PH. Expression of the grapevine stilbene synthase gene *VST1* in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. **Planta** 2004; 220: 241-250.

Liste des tableaux et des figures

Tableau 1 Distribution relative (%) des classes chimiques de cires cuticulaires de diverses espèces végétales.

Tableau 2 Composition des cires cuticulaires selon la longueur de chaîne carbonée et la classe chimique des composés identifiés provenant de la surface adaxiale de feuilles de *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*.

Tableau 3 Quantification des cires cuticulaires ($\mu\text{g cm}^{-2}$) foliaires en fonction de leur localisation chez *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*.

Tableau 4 Composition absolue ($\mu\text{g cm}^{-2}$) et relative (%) des cires épicuticulaires et intracuticulaires de la surface adaxiale de feuilles de *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*.

Tableau 5 Taux de germination et de formation d'appressoria d'*E. necator* sur différents supports de développement.

Tableau 6 Activité estérase dans les extraits protéiques cytoplasmiques et pariétaux des conidies non germées d'*E. necator*.

Tableau 7 Radioactivité libérée par l'activité cutinase de l'extrait pariétal des conidies non germées d'*E. necator*.

Tableau 8 Monomères de cutine constitutifs des espèces *V. vinifera* cv Chasselas et *V. candicans*.

Tableau 9 Concentrations en phytoalexines stilbéniques produites par différents cultivars de vigne, de 1 à 5 jours après infection par *E. necator*.

Tableau 10 Calculs de la concentration en phytoalexines stilbéniques de différents cultivars de vigne de 1 à 5 jours post infection par *E. necator*, rapportées au nombre d'appressoria observés.

Tableau 11 Marqueurs liés aux critères phénotypiques de résistance.

- - - - -

Figure 1 Description d'*E. necator* par Saccardo dans l'ouvrage intitulé *Sylloge Fungorum*, volume I, p. 22 (1882).

Figure 2 Anamorphe d'*E. necator* d'après Bolay (2005).

Figure 3 Cleistothèces d'*E. necator* observés en microscopie photonique.

Figure 4 Cycle biologique et caryologique d'*E. necator*.

Figure 5 Symptômes d'oïdium observés sur feuille de *V. vinifera* cv Chasselas (A) et sur grappe de *V. vinifera* cv Sylvaner (B).

Figure 6 Coupe transversale schématisée de la partie supérieure de l'épiderme végétal (d'après Jeffree, 1986).

Figure 7 Voies de biosynthèse du resvératrol et de ses dérivés (d'après Pezet *et al.*, 2003).

Figure 8 Références pour la notation des critères phénotypiques de sensibilité à l'oïdium selon la surface moyenne de sporulation et l'intensité de sporulation.

Figure 9 Cycle de développement asexué d'*E. necator* sur *V. vinifera* cv Chasselas, observé au microscope électronique à balayage.

Figure 10 Coupe transversale en microscopie électronique à transmission d'une cellule épidermique de *V. vinifera* cv Chasselas infectée par *E. necator*.

Figure 11 Comportement d'*E. necator* sur des disques foliaires à 2 jpi.

Figure 12 Structure fongique d'*E. necator* à la surface de *V. candicans*, observée au microscope électronique à transmission.

Figure 13 Morphologie de l'appressorium primaire d'*E. necator* observé au microscope électronique à balayage.

Figure 14 Observations en épifluorescence des tubes germinatifs et appressoria sur *V. vinifera* cv Chasselas (A), IRAC 2292 (B), *V. candicans* (C) et *Muscadinia rotundifolia* (D).

Figure 15 Réalisation du cycle infectieux d'*E. necator* sur différentes espèces de *Vitis*.

Figure 16 Structures de reproduction sexuée d'*E. necator*.

Figure 17 Quantités de cires épicuticulaires et intracuticulaires de *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans* extraites après trois applications successives de gomme arabique, puis une extraction chimique finale.

Figure 18 Observations au MET et au MEB des motifs de cristallisation de la surface adaxiale de feuilles d'espèces sensibles et résistantes à *E. necator*.

Figure 19 Observation au MEB de la surface adaxiale foliaire après traitement à la gomme arabique (suppression des cires épicuticulaires) et traitement au chloroforme (suppression des cires cuticulaires totales).

Figure 20 Composition des cires épicuticulaires (A) et intracuticulaires (B) selon la longueur de chaîne carbonée et la classe chimique des composés identifiés chez *V. vinifera* cv. Chasselas et *V. candicans*.

Figure 21 Premiers stades de développement d'*E. necator* à la surface adaxiale de *V. vinifera* cv. Chasselas et de *V. candicans*; après suppression de la couche de cires épicuticulaires par traitement à la gomme arabique.

Figure 22 Chromatographie en couche mince de cires cuticulaires extraites au chloroforme de *V. vinifera* cv. Chasselas et de *V. candicans*.

Figure 23 Localisation histochimique de l'activité cutinase dans les conidies d'*E. necator* visualisée par la formation de cristaux indigo aux sites d'hydrolyse.

Figure 24 Observations au microscope électronique à balayage des premiers stades infectieux d'*E. necator* sur *Vitis vinifera* cv. Chasselas.

Figure 25 Effet d'une concentration croissante de stilbènes sur la germination des conidies d'*E. necator* 24 hpi.

Figure 26 Calcul de la concentration de ptérostilbène permettant l'inhibition de 50% de la germination des conidies d'*E. necator*, à partir d'une courbe sigmoïde "dose-réponse" (Sigmaplot regression wizard module)

Figure 27 Séquences infectieuses d'*E. necator* sur quatre cultivars observés au MEB et comptabilisation du nombre de sites infectieux.

Figure 28 Comparaison du contenu en phytoalexines stilbéniques entre une zone sporulante et une zone périphérique saine, observées sur *V. vinifera* cv. Chasselas.

Figure 29 Distribution des génotypes de la sous-population (n = 94) pour chaque critère phénotypique.

Figure 30 Variabilité des critères phénotypiques évalués sur les génotypes inclus dans chaque expérimentation.

Figure 31 Schéma récapitulatif des premiers évènements de l'établissement de l'interaction *E. necator*-*Vitis*.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Centre National de Compétences en Recherche (NCCR Plant Survival) pour m'avoir permis de réaliser ce travail, à travers son support financier et l'opportunité de participer aux cours du programme doctoral; ainsi que le Prof. Jean-Marc Neuhaus, responsable du groupe de travail "Maladies de la vigne et mécanismes de résistance" dans lequel s'inscrit mon doctorat, pour présider le jury de thèse.

Je remercie l'ensemble du comité de thèse pour avoir suivi mes travaux et y apporter leurs commentaires.

Un travail de doctorat peut se définir comme la mise en œuvre de collaborations scientifiques apportant des réponses aux hypothèses initiales, mais également une aventure humaine où se créent des amitiés; aussi souhaiterais je remercier bon nombre de personnes:

Didier Merdinoglu pour avoir entrepris le partenariat entre nos deux instituts et mis à disposition une population d'étude; ainsi qu'Emilce Prado pour la réalisation de la partie "génotypage" et son aide précieuse dans l'analyse des données. Une fois de plus, j'ai appris et pris du plaisir à travailler avec le laboratoire de Génétique et d'Amélioration de la vigne de l'INRA de Colmar... *What else?*

André Rawyler, qui a pris de son temps administratif si précieux pour m'initier aux péripéties de la chromatographie en phase gazeuse. Si j'ai pu t'extirper de tes contraintes bureaucratiques l'espace de quelques instants en sollicitant tes bons conseils, j'espère de tout cœur qu'un priapisme scientifique honorera la fin de ta carrière...

Antonio Mucciolo et Michel Bonin du Centre de Microscopie Electronique de Lausanne pour leurs précieux conseils et nos tentatives audacieuses en matière de microscopie électronique à balayage...

Francine Voinesco, qui, dans la recherche de l'aiguille dans une botte de foin, a trouvé... la bobine de fil! Un grand merci pour ce long et fastidieux labeur de découvrir un haustorium là où il n'y en a peut-être pas...

Jean Taillens pour toutes sortes de cultures: la culture des bêtes de laboratoire, la culture du calembour, la culture de mon esprit... et ta belle leçon de vie.

Isabelle De Groote pour son assistance technique toujours souriante, son cours de cuisine qui me permettent aujourd'hui de réussir une sauce béchamel les yeux fermés. Tout de bon à toi !

Bernard Bloesch, médecin attiré contre le *Botrytis* humain, a su me mettre en garde contre le mariage et les impôts...

Anne-lise Fabre, dit ALF, extra-terrestre à proprement parlé, passionnée de course automobile, confidente bien-aimée des doctorants à ses heures de bureau...

Leonardo Casieri, charmeur latin aux critiques constructives, aimant partager ses connaissances scientifiques et... quelques bières!

Sophie Godard, Team Partner sur de nombreuses expérimentations et oreille attentive à mes doléances. Le partage des problèmes scientifiques, techniques et plus personnels a été très enrichissant; simplement Merci!

Evelyne Brandt où le soupir rieur de la pause café, aussi jeune que son humour...

Le groupe de Mycologie pour leur aide spontanée et leur sourire quotidien...

Une pensée pour Roger Pezet, qui malgré ses pérégrinations ensoleillées, apporte toujours de précieux conseils dans l'élaboration du travail.

Mesdames Mills et Brunner-Pathay, bibliothécaires dans la pure tradition d'efficacité redoutable de Mme Romoscanu, qui m'ont apporté une grande aide dans l'acquisition de la bibliographie.

Enfin les mastodontes formant l'« inteam » mycologique :

Katia Gindro, à l'interface entre le clownesque et le rigorisme scientifique, mon éducation doctorale oscilla entre la fameuse et non moins célèbre « Quick and Dirty Science » et tes solutions déroutantes à tous problèmes scientifiques et techniques... Merci de m'avoir consacré tout ce temps et de m'avoir fait bénéficier de ton expérience.

Olivier Viret, infatigable polyglotte qui a su me guider et me stimuler par ses discussions instructives tout au long de ma thèse. Bon vent dans tes nouvelles fonctions !

En vrac, toute personne ayant apporté directement ou indirectement une pierre à l'édifice : Jean Pierre De Joffrey (pour m'avoir prêté son *Linomat IV* et bien plus...), André Savoy (fournitures diverses et variées), Serge Kreiter (pour les contraintes administratives de début de thèse), Hannes Richter ("grand frère scientifique" et escapades californiennes), Gilles (futur doctorant en chimie, je l'espère, et contributeur du Tableau 8)...

La famille Terry-Guikas pour avoir partagé ce petit bout de paradis buzellois et bien plus encore...

Un clin d'œil au manuscrit de 3 tomes de 400 pages chacun, de l'ami de Georges Deleuze, qui n'a pas freiné mon enthousiasme doctoral...

Une pensée à ma famille pour leurs encouragements discrets et continus, et un grand merci au coup de crayon artistique de Papus...

Enfin, un gros « bec » chocolaté à celle qui partage les humeurs vagabondes de l'auteur de ces mots...