

Université de Reims Champagne-Ardenne
Ecole doctorale Sciences, Technologies et Santé

THESE

Présentée à
l'UFR Sciences Exactes et Naturelles

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Biologie des organismes

par

Maryline MAGNIN-ROBERT
UR Vignes et Vins de Champagne – EA 2069

PROTECTION DE LA VIGNE CONTRE *BOTRYTIS CINEREA* ET STIMULATION DES MECANISMES DE DEFENSE A L'AIDE DE BACTERIES ISSUES DU VIGNOBLE CHAMPENOIS

Soutenue le 23 Novembre 2007 devant les membres du Jury :

M. ROUSTAN J.-P.	Professeur, INP-ENSAT, Toulouse	Rapporteur
M. ONGENA M.	Directeur de Recherche FNRS, Gembloux	Rapporteur
M. AZIZ A.	Maître de Conférences - HDR, Université de Reims CA	Directeur thèse
Mme. BAILLIEUL F.	Professeur, Université de Reims CA	Examineur
M. BOULAY M.	Conseiller Scientifique, Moët & Chandon, Epernay	Examineur
Mme TROTEL-AZIZ P.	Maître de Conférences, Université de Reims CA	Co-encadrant
M. QUANTINET D.	Président de la Commission Technique CIVC, Epernay	Membre invité

Résumé - Le développement de nouvelles alternatives à la lutte chimique contre *Botrytis cinerea* chez la vigne, notamment par recours à l'utilisation des bactéries issues du vignoble champenois fait l'objet de cette thèse. Ces bactéries, isolées de la rhizosphère et de différents organes de vignes non contaminées, sont deux *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et PTA-152, une *Bacillus subtilis* PTA-271, deux *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 ainsi que deux *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2. Les expériences réalisées de manière principale en conditions du vignoble, font apparaître que ces bactéries appliquées en souches pures ou en mélanges de souches sont capables d'induire des réactions de défense chez la vigne matérialisées par une stimulation des activités de chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles et les baies de vigne. Ces réactions typiques de défense sont variables selon la souche, les combinaisons de souches et leur mode d'application, et sont pour la plupart associées à une protection des différents organes de la vigne contre *Botrytis cinerea*. Les souches les plus actives sont représentées par les *A. lwoffii*, *P. fluorescens* et *P. agglomerans* PTA-AF1 chez les feuilles et *P. agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 chez les baies. L'association des deux *P. agglomerans* (AF1+AF2) ou encore *P. agglomerans* en présence de *B. subtilis* ou d'*A. lwoffii* se traduit aussi par une protection significative contre *B. cinerea*, ne dépassant pas celle obtenue en présence des bactéries individuelles.

Suite à l'application des bactéries au sol en 2003 et 2004, les réactions de défense induites sur le plan spatio-temporel et la protection sous-jacente indiquent que les souches les plus efficaces sont capables d'induire une résistance systémique chez la vigne. Des taux de protection importants obtenus en 2005 sans nouvelles applications des bactéries viennent conforter l'hypothèse selon laquelle ces effets bénéfiques peuvent résulter de l'origine et la source des bactéries sélectionnées et donc de leur adaptation aux facteurs de l'environnement, qui peuvent contribuer au maintien des bactéries à des niveaux suffisants dans la rhizosphère ou dans les tissus de la plante pour lutter contre le pathogène.

Les expériences réalisées dans les conditions contrôlées sur des feuilles de vitoplants ont montré que certaines des bactéries étudiées sont capables d'éliciter d'autres réactions caractéristiques de défense de la vigne, à savoir une simulation transitoire de l'activité lipoxigénase accompagnée d'une baisse précoce de la teneur en acide gras poly-insaturés libres. Elles ont également permis de distinguer des différences significatives entre les souches bactériennes dans l'induction de la voie de lipoxigénase et des modifications des teneurs en acides gras polyinsaturés libres dans les tissus foliaires de la vigne, et ceci malgré un taux de protection similaire contre *Botrytis cinerea*. Ces résultats suggèrent que les signaux conduisant à l'induction d'une résistance chez la vigne sont différents d'une bactérie à l'autre. Par ailleurs, il s'avère que les réactions induites sont associées à une colonisation des tissus foliaires par les bactéries, toutes deux dépendantes de la densité des populations bactériennes dans le milieu. Dans la majorité des cas, une concentration bactérienne minimale de 1×10^4 UFC ml⁻¹ semble nécessaire à la mise en place de la résistance et de la stimulation des réactions de défense.

Abstract - The development of new alternatives to chemicals against *Botrytis cinerea* in grapevine, especially by using bacteria originated from Champagne vineyard is the objective of this thesis. These bacteria isolated from the rhizosphere and from different healthy grapevine organs, are two *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 and PTA-152, a *Bacillus subtilis* PTA-271, two *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 and PTA-AF2 and two *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 and PTA-CT2. Experiments performed mainly in vineyard demonstrated that these bacteria applied individually or in combination are able to induce defence reactions in grapevine as shown by a stimulation of chitinase and β -1,3-glucanase activities in leaves and berries. The intensity of these defence reactions is dependent on bacterial strain, combination of bacteria and their application method. They are associated to an induced protection of both organs against *Botrytis cinerea*. The most active strains are *A. lwoffii*, *P. fluorescens* and *P. agglomerans* PTA-AF1 in leaves and *P. agglomerans* PTA-AF1 and PTA-AF2 in berries. The combination of two *P. agglomerans* (AF1+AF2) or *P. agglomerans* with *B. subtilis* or with *A. lwoffii* also lead to a significant protection against *B. cinerea*, which is not higher than that obtained with individual bacteria.

When bacteria were applied in the soil during 2003 and 2004 growing seasons, the spacio-temporal evolution of defence reactions and subsequent protection suggest that the efficient strains are able to induce systemic resistance in grapevine. The strong protection obtained during 2005 without renewal of bacterial inoculation suggests that these beneficial effects could be related to the origin and source of selected bacteria and therefore to their adaptation to environmental factors, which could contribute to the maintenance of bacteria at a sufficient level in the rhizosphere or in plant tissues to counteract pathogen.

Experiments performed under controlled conditions with detached leaves from in vitro plantlets have shown that some of selected bacteria can elicit other defence reactions in grapevine, such as a transient stimulation of lipoxygenase activity accompanied with a rapid decrease of free polyunsaturated fatty acid content. Results also have shown some significant differences between bacterial strains in the induction of lipoxygenase pathway and change of free fatty acid content in leaf tissues, even if protective levels remained similar against *Botrytis cinerea*. These results suggest that signals leading to an induced resistance in grapevine could be different from bacterial strain to another. Furthermore, the induced reactions are shown to be associated to a strong colonisation of leaf tissues by bacteria, both being dependent on the density of bacterial populations in the medium. In most cases a minimal concentration of 1×10^4 CFU ml⁻¹ seems necessary to promote resistance and defence reactions in plant.

REMERCIEMENTS

Ce travail financé par EUROPOL'AGRO a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne aux laboratoires d'Eco-Toxicologie et de Plantes, Pesticides et Développement Durable (PPDD).

Je tiens à remercier Monsieur Aziz AZIZ, Maître de Conférences à l'Université de Reims, directeur de thèse et co-encadrant scientifique, qui par ses conseils, sa rigueur, sa patience et son soutien, m'a permis d'achever ce travail de thèse.

Je tiens aussi à manifester ma reconnaissance à Patricia TROTEL-AZIZ, Maître de Conférences à l'Université de Reims et co-encadrant(e) scientifique de cette thèse, pour ses qualités scientifiques et pédagogiques, ses encouragements et sa disponibilité.

J'adresse également mes remerciements à Madame Sylvie BIAGIANTI, Professeur à l'Université de Reims et co-directeur de cette thèse pour son accueil au sein du laboratoire d'Eco-toxicologie.

J'exprime aussi mes remerciements à Monsieur Michel COUDERCHET, Professeur à l'Université de Reims, pour l'intérêt porté à ce sujet.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Messieurs Jean-Paul ROUSTAN, Professeur à l'INP-ENSAT et Marc ONGENA Docteur Chercheur FNRS à l'Université de Gembloux, pour avoir accepté d'examiner ce travail en qualité de rapporteurs.

Je tiens également à remercier Madame Fabienne BAILLIEUL, Professeur à l'Université de Reims et Monsieur Michel BOULAY, Conseiller Technique et Scientifique chez Moët et Chandon (Epernay), pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Daniel QUANTINET, Président de la commission technique du CIVC pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude au vignoble, et aux membres du Groupement de Développement Viticole pour leur aide technique précieuse et efficace.

Il m'est aussi agréable d'exprimer mes remerciements à toutes les personnes, collègues, enseignants-chercheurs, personnels techniques, post-doctorants, doctorants, stagiaires, joyeux participants de la BH qui ont contribué par leur soutien au bon déroulement de mes travaux, mais également à mes premiers pas en tant qu'enseignante... qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude et de mon amitié.

A ma collègue de bureau, Rachel, qui par son soutien, sa patience (surtout lorsque les piles de documents situés sur mon bureau finissaient par atteindre le sien sous l'effet de la force de gravité...), son fameux gâteau au chocolat, nos discussions concernant les musées de Reims, les horaires d'ouverture de l'observatoire ou encore sa passion pour le VTT, ont contribué à maintenir ma motivation à l'achèvement de ce travail.

Un remerciement matinal à celles et ceux qui ont toujours répondu « présents » aux cafés du matin... entre 7H15 et 8H10... en fonction des jours (et des périodes de vacances des enfants).

Un remerciement particulier pour mes amis d'avant thèse (d'Alsace, d'Angers et d'Ailleurs...) qui, malgré les distances et la faible fréquence de nos rencontres ont toujours représenté pour moi des brassées d'air frais.

Un merci à Claire pour son soutien, sa cuisine sans viande ni poisson et les visites ponctuelles de l'adorable, mais non moins fatigante, boule de poil nommée Vlad.

Je tiens également à exprimer ma sincère reconnaissance aux toujours disponibles Christelle, Élise et Émilie qui m'ont apporté une aide morale constante (avec ou sans chocolat, madame loïc, danette crousti ou footing) quand le besoin s'en faisait sentir. J'aime à croire que nous nous suivrons même après cette étape du doctorat.

Une attention particulière aux Bobos de Reims, Bioseb, Hélène & Stéphan, Patroger et Véra qui par leur soutien, leur talent de cuistots, leur amitié et leur action pour la création d'une politique de squat m'ont aidé à tenir et à poursuivre ce travail jusqu'à son terme. Oui, je vous le dis, nous continuerons à refaire le monde devant un verre... et une tranche de pâté de lapin.

Enfin je tiens à exprimer ma plus affectueuse reconnaissance à ma famille (rajeunie ce mois dernier par l'arrivée des jumeaux : Mattéo et Nathan), en particulier à mes parents, ma sœur et mon frère et leurs « pièces rapportées » qui par leur soutien constant, leur présence et leurs encouragements m'ont permis de progresser dans mes études, dans ma vie et d'achever ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1 INTERACTIONS VITIS VINIFERA – BOTRYTIS CINEREA	6
2 LUTTE CHIMIQUE CONTRE LA POURRITURE GRISE.....	7
3 METHODES ALTERNATIVES A LA LUTTE CHIMIQUE	9
3.1 INDUCTION DES MECANISMES DE DEFENSE DES PLANTES	9
3.2 REACTIONS DE DEFENSE CHEZ LA VIGNE	17
3.2.1 Défenses constitutives	17
3.2.2 Défenses induites par les pathogènes.....	18
3.3 ELICITEURS DES REACTIONS DE DEFENSE.....	22
3.4 AMELIORATION DE LA RESISTANCE DE LA VIGNE PAR TRANSFORMATION GENETIQUE.....	23
3.5 LUTTE BIOLOGIQUE	28
3.5.1 Diversité des agents de la lutte biologique.....	28
3.5.2 Mécanismes d'actions des bactéries impliqués dans la lutte biologique	31
4 LUTTE BIOLOGIQUE CHEZ LA VIGNE	40
MATERIEL ET METHODES.....	42
1 MATERIEL BIOLOGIQUE	43
1.1 BACTERIES.....	43
1.1.1 Description des bactéries sélectionnées.....	43
1.1.2 Culture et utilisation des bactéries.....	45
1.2 BOTRYTIS CINEREA	45
1.3 MATERIEL VEGETAL	47
1.3.1 Conditions de culture et obtention de vitroplants	47
1.3.2 Dispositifs expérimentaux au vignoble.....	47
1.3.3 Traitements.....	50
2 METHODES D'ANALYSE.....	52
2.1 EVALUATION DE L'EFFET DES BACTERIES SUR LA PROTECTION DE LA VIGNE CONTRE <i>B. CINEREA</i>	52
2.1.1 Au laboratoire.....	52
2.1.2 Au vignoble.....	53
2.1.3 Intensité de contamination des baies.....	53
2.2 ESTIMATION DE LA COLONISATION DES TISSUS FOLIAIRES PAR LES BACTERIES	53
2.3 DETERMINATION DES REACTIONS DE DEFENSE CHEZ LA VIGNE.....	54
2.3.1 Activité lipoxygénase.....	54
2.3.2 Activité phénylalanine-ammonia-lyase (PAL).....	55
2.3.3 Activités chitinase et β -1,3-glucanase	55
2.4 ANALYSE DES ACIDES GRAS TOTAUX ET LIBRES	56
2.4.1 Extraction des acides gras	56
2.4.2 Transestérification	57
2.4.3 Séparation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	57
2.4.4 Identification et quantification	58
2.5 ANALYSES STATISTIQUES	58

CHAPITRE 1

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *B. CINEREA* A L'AIDE DE BACTERIES ISOLEES DU VIGNOBLE ET MARQUEURS DE DEFENSE DE LA VIGNE.....59

1	INTRODUCTION	60
2	RESULTATS	62
2.1	EVALUATION DE LA PROTECTION DE LA VIGNE CONTRE <i>B. CINEREA</i>	62
2.1.1	<i>Comparaison de différentes méthodes d'application des bactéries au vignoble.....</i>	<i>62</i>
2.1.2	<i>Evaluation de la résistance systémique induite par les bactéries</i>	<i>66</i>
2.2	EFFET DES BACTERIES SUR LES REACTIONS DE DEFENSE DE LA VIGNE	71
2.2.1	<i>Effet des méthodes d'application des bactéries sur les réactions de défense de la vigne</i>	<i>71</i>
2.2.2	<i>Evaluation de l'activité systémique des bactéries vis-à-vis des réactions de défense de la vigne.....</i>	<i>77</i>
2.2.3	<i>Relation entre la résistance de la vigne contre <i>B. cinerea</i> et les activités chitinase et β-1,3-glucanase.....</i>	<i>88</i>
3	DISCUSSION.....	88

CHAPITRE 2

EFFETS DE COMBINAISONS DE BACTERIES SUR LA PROTECTION CONTRE *B. CINEREA* ET STIMULATION DES DEFENSES DE LA VIGNE DANS LES CONDITIONS DU VIGNOBLE.....96

1	INTRODUCTION	97
2	RESULTATS	100
2.1	EVALUATION DE LA RESISTANCE DE LA VIGNE A <i>B. CINEREA</i> SUITE A L'APPLICATION DES MELANGES DE BACTERIES	100
2.1.1	<i>Effet des mélanges de bactéries sur la protection des feuilles contre <i>B. cinerea</i>.....</i>	<i>101</i>
2.1.2	<i>Effet des mélanges de bactéries sur la protection des baies contre <i>B. cinerea</i>.....</i>	<i>103</i>
2.2	EFFET DES MELANGES DE BACTERIES SUR LES REACTIONS DE DEFENSE DE LA VIGNE	107
2.2.1	<i>Activités chitinase et β-1,3-glucanase dans les feuilles.....</i>	<i>107</i>
2.2.2	<i>Activités chitinase et β-1,3-glucanase dans les baies.....</i>	<i>110</i>
2.2.3	<i>Activité de la phénylalanine ammonia lyase (PAL) dans les feuilles de vigne suite à l'application des mélanges de bactéries au vignoble.....</i>	<i>112</i>
2.3	APPROCHE COMPARATIVE DES EFFETS DE DIFFERENTES METHODES D'APPLICATION DES MELANGES BACTERIENS	115
2.3.1	<i>Effet sur la protection des feuilles contre <i>B. cinerea</i></i>	<i>115</i>
2.3.2	<i>Effets sur les réactions de défense de la vigne</i>	<i>117</i>
3	DISCUSSION.....	121

CHAPITRE 3

EFFETS DES BACTERIES SUR L'ACTIVITE LIPOXYGENASE ET LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES FEUILLES DE VIGNE.....125

1	INTRODUCTION	126
2	RESULTATS	128
2.1	ACTIVITE DE LA LIPOXYGENASE DANS LES TISSUS FOLIAIRES DE VIGNE	128
2.2	COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES TISSUS FOLIAIRES DE VIGNE.....	130
2.2.1	<i>Acides gras totaux</i>	130
2.2.2	<i>Acides gras libres</i>	135
2.3	EFFET DES CONCENTRATIONS BACTERIENNES SUR LA PROTECTION DES FEUILLES DE VIGNE CONTRE <i>B. CINEREA</i>	137
2.4	COLONISATION DES FEUILLES PAR LES BACTERIES	137
3	DISCUSSION.....	139

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....143

ANNEXES.....149

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....157

ABREVIATIONS

DIVERS

AGPI	acide gras polyinsaturé
AHL	N-acyl homosérine lactone
AOC	appellation d'origine contrôlée
BABA	acide β -3-amino-n-butyrique
BHT	butyl hydroxy toluène
BTH	S-méthyl-ester benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic ou acibenzolar-S-méthyl
C16:0	acide palmitique
C16:1	acide palmitoléique
C16:2	acide palmitoléique
C16:3	acide hiragonique
C18:0	acide stéarique
C18:1	acide oléique
C18:2	acide linoléique
C18:3	acide linoléique
CAD	alcool cinnamique déshydrogénase
UFC	unité formant colonie
CHI	chalcone isomérase
CHS	chalcone synthase
CIVC	Comité Interprofessionnel des Vins de Champagne
CR	Cernay-les-Reims
cv.	cultivar
DAPG	2,4-diacetylphloroglucinol
DTT	dithiothreitol
EPS	exopolysaccharide
<i>etr1</i>	ethylene receptor 1
FAO	formes actives de l'oxygène
GTP	guanosine triphosphate
GST	glutathion-S-transférase
HRGP	protéine riche en hydroxyproline ou « hydroxyprolin-rich glycoprotein »
H ₂ O ₂	péroxyde d'hydrogène
HR	réaction d'hypersensibilité
INA	acide 2,6-dichloroisonicotinique
ISR	résistance systémique induite
JA	acide jasmonique
<i>jar1</i>	jasmonate response 1
LAR	résistance locale acquise
LOX	lipoxygénase
LPS	lipopolysaccharide
LTP	protéine de transfert de lipides ou « lipid transfer protein »
KDa	kilodalton
MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
MeJA	méthyle jasmonate ou jasmonate de méthyle
<i>NahG</i>	naphthalene hydroxylase gene
NL	Nogent l'Abbesse

<i>npr1</i>	non-expresser of PR gene 1
OGA	α -1,4-oligogalacturonide
OILB	organisation internationale de lutte biologique
OGM	organisme génétiquement modifié
p/p	rapport poids/poids
p/v	rapport poids/volume
PAL	phénylalanine ammonia lyase
PGIP	protéine inhibitrice de polygalacturonase
PGPR	plant growth promoting rhizobacteria
PIN	protéine inhibitrice de protéase
PKC	protéine kinase C
PLA	phospholipase A
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PMSF	phénylméthylsulfonylfluoride
protéine PR	protéine "pathogenesis related"
pv.	pathovar
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
RIP	« ribosome-inactivating protein »
rpm	rotation par minute
SA	acide salicylique
SAR	résistance systémique acquise
STS	stilbène synthase
UV	ultra-violet
var.	variété

ORGANISMES

<i>A. lwoffii</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>E. lata</i>	<i>Eutypa lata</i>
<i>E. necator</i>	<i>Erysiphe necator</i>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>F. solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>P. agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. parasitica</i>	<i>Peronospora parasitica</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<i>P. ultimum</i>	<i>Pythium ultimum</i>
<i>P. viticola</i>	<i>Plasmopara viticola</i>
<i>V. rupestris</i>	<i>Vitis rupestris</i>
<i>V. vinifera</i>	<i>Vitis vinifera</i>

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La vigne est sujette à de nombreuses maladies cryptogamiques telles que celles causées par *Botrytis cinerea* agent de la pourriture grise, *Plasmopara viticola* agent de l'oïdium ou encore *Erysiphe necator* agent du mildiou, conduisant non seulement à une diminution sensible du volume de récolte, mais aussi à d'importantes altérations de la qualité organoleptique des vins produits (dégradation des sucres et des acides et oxydation des composés phénoliques du vin). De plus, la vigne est une monoculture pour laquelle on ne peut pas avoir recours à la stratégie de rotation des cultures pour atténuer ces maladies. Ainsi, la lutte contre les agents de ces maladies s'effectue principalement au moyen de produits phytosanitaires de synthèse. L'utilisation de tels produits se trouve aujourd'hui remise en cause: impasses chimiques, collectivité soucieuse d'un environnement sain, professionnels de l'agriculture attentifs aux améliorations de leurs conditions de travail. De nombreuses matières actives sont ainsi progressivement retirées du marché (révision européenne des substances phytosanitaires dans le cadre de la directive 91/414/CE), bien qu'elles laissent des usages non couverts. Ainsi, la réglementation en matière de lutte chimique plus restrictive au niveau européen suscite chez les professionnels un intérêt croissant pour des méthodes alternatives de lutte contre les agents pathogènes plus respectueuses de l'environnement et compatibles avec les appellations d'origines contrôlées.

Différentes approches ont fait l'objet d'investigations : (1) la possibilité de substituer aux fongicides de synthèse des biopesticides à action directe sur le pathogène et (2) rendre la vigne moins vulnérable aux pathogènes, donc moins dépendante des pesticides. La dernière méthode est basée sur l'exploitation des défenses naturelles de la plante et donc sur l'augmentation de sa résistance aux agents pathogènes. Dans ce contexte, l'induction de la résistance de la plante à l'aide d'éliciteurs oligosaccharidiques ou protéiques (Aziz *et al.*, 2003 ; Poinssot *et al.*, 2003 ; Aziz *et al.*, 2007) ou de rhizobactéries (Compant *et al.* ; 2005 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2007 ; Magnin-Robert *et al.*, 2007) semble être l'une des alternatives très prometteuses à l'emploi de fongicides chimiques.

Plusieurs bactéries du genre *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Bacillus* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement attrayantes pour protéger les plantes contre les pathogènes. Pour la plupart, ces bactéries ont une capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population remarquable (Haas et Keel 2003), sans doute grâce aux échanges de métabolites avec la plante

au niveau de la rhizosphère. De nombreuses rhizobactéries sont capables d’agir directement sur l’agent pathogène (par compétition vis-à-vis des éléments nutritifs ou de l’espace, par antibiose ou par parasitisme), ou indirectement *via* l’induction d’une résistance systémique (ISR) chez la plante hôte, ce qui engendre une protection contre un grand nombre d’agents pathogènes fongiques et bactériens (Van Loon *et al.*, 1998). Cependant la nature des mécanismes impliqués dans le déclenchement de cette ISR reste un sujet à controverse. Cette résistance a souvent été comparée à la résistance systémique acquise (SAR) traditionnellement induite par des pathogènes et qui consiste en l’activation d’un certain nombre de réactions de défense qui permettent l’induction et le maintien d’un état de résistance de la plante entière contre un large spectre d’agents pathogènes.

Chez la vigne, différentes réactions de défense ont été mises en évidence au cours de son interaction avec des pathogènes fongiques et bactériens (Jeandet *et al.*, 1995 ; Robert *et al.*, 2002). Ces réactions concernent en particulier l’accumulation de phytoalexines stilbéniques et l’expression de différentes protéines PR parmi lesquelles certaines ont une activité hydrolytique comme les chitinases et les β -1,3-glucanases (Jeandet *et al.*, 1995 ; Bézier *et al.*, 2002). Ces réactions ont également été exprimées dans les différents organes de la vigne en réponses à des éliciteurs biotiques et abiotiques (Derckel *et al.*, 1996 ; Bonomelli *et al.*, 2002 ; Aziz *et al.*, 2003) et sont souvent mises en relation avec le caractère de tolérance ou de résistance de la vigne à de nombreux pathogènes (Reuveni, 1998a, Derckel *et al.*, 1999).

Notre étude s’appuie sur la sélection de bactéries issues du vignoble Champenois et capables de protéger des feuilles de vitroplants de vigne vis-à-vis de *Botrytis cinerea* sous conditions contrôlées (Trotel-Aziz *et al.*, 2007). Les effets protecteurs observés sont liés pour une grande part à un effet inducteur de certaines réactions de défense de la vigne (Trotel-Aziz *et al.*, 2007; Magnin-Robert *et al.*, 2007). L’utilisation de bactéries locales en lutte biologique peut contribuer à préserver non seulement l’équilibre de l’agrosystème « vignoble », mais aussi le caractère originel des cépages et la typicité des vins de terroir. La diversité des souches peut aussi être exploitée afin de trouver une combinaison de souches ayant un pouvoir de protection optimale.

Les travaux réalisés dans cette thèse s’inscrivent dans une perspective d’une viticulture durable en proposant une stratégie de protection qui vise à utiliser des bactéries issues du vignoble, en souche pure ou en mélange de souches pour déclencher les défenses naturelles de la vigne et donc induire sa résistance aux agents pathogènes. Ces bactéries bien identifiées sur le plan physiologique et moléculaire sont de différents genres ou espèces : *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans* et *Pseudomonas fluorescens*. Elles peuvent

donc satisfaisant aux exigences de la directive 91/414 relative à la mise sur le marché des produits de protection des plantes.

A ce jour, peu d'études ont fait l'objet d'application de bactéries dans des conditions de champs et souvent les résultats ne sont pas reproductibles. Divers facteurs peuvent être mis en cause, rendant les bactéries inopérantes ou la plante moins réceptive, ou encore le pathogène plus virulent. Sur le plan des applications et afin d'optimiser l'efficacité de la lutte biologique contre *B. cinerea*, les bactéries ont été appliquées au vignoble selon trois modalités différentes : infiltration, pulvérisation foliaire et application au sol. La capacité protectrice des bactéries au vignoble a été évaluée sur les feuilles et sur les baies. L'application des bactéries n'a pas été renouvelée en 2005, dans le but d'évaluer la persistance des souches inféodées à la vigne et leur potentiel protecteur contre *B. cinerea*. D'autre part la capacité des bactéries à stimuler les défenses naturelles de la vigne est déterminée principalement *via* la mesure de l'activité de deux types de protéines de défenses (chitinases et β -1,3-glucanases) et dans certains cas de la phénylalanine ammonia lyase. Ces réactions sont déterminées dans les feuilles et dans les baies au cours des différents stades de développement de la vigne en 2003 et en 2004. D'autres approches ont été effectuées au laboratoire sur des feuilles de vitroplants de vigne, pour lesquelles l'objectif principal est de mettre en relation l'amplitude de certaines réactions de défense induites (activité lipoxygénase, évolution des teneurs en acides gras libres et totaux) avec la colonisation des tissus foliaires. La finalité est d'obtenir au moins une souche ou un mélange de souches avec des caractéristiques bien déterminées, qui procure à la vigne un état de résistance à l'égard de l'agent pathogène.

C ONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Interactions *Vitis vinifera* – *Botrytis cinerea*

La vigne (*Vitis vinifera* L.) est soumise à des bioagresseurs très différents, en fonction des conditions pédoclimatiques qui règnent dans les vignobles. De manière générale, ce sont les champignons pathogènes qui constituent les principaux ennemis de la vigne. *Botrytis cinerea* (agent de la pourriture grise), *Plasmopara viticola* (agent du mildiou) et *Erysiphe necator* (agent de l'oïdium), à eux seuls, peuvent causer des dégâts considérables à tous les stades du développement de la vigne.

B. cinerea se situe à la frontière entre le saprophytisme et le parasitisme, sa présence est parfois souhaitée dans diverses régions viticoles pour son évolution en pourriture noble, contribuant à l'élaboration de vins liquoreux (sauternes et vendanges tardives). Néanmoins, la pourriture grise, causée par *B. cinerea*, est redoutée. C'est une maladie ancienne connue depuis l'antiquité, qui est particulièrement préoccupante en Champagne en raison du climat propice à son développement, elle occasionne des dégâts tant au niveau quantitatif (jusqu'à 40% de réduction du rendement) qu'au niveau qualitatif. Ainsi, l'élaboration des vins est affectée par une perte de la qualité tant sur le plan gustatif que sur la stabilité de mousse des vins effervescents (Marchal *et al.*, 2001). La fermentation des vins issus de raisins contaminés est longue et leur clarification est rendue difficile. Enfin, l'altération des vins diminue leur période de conservation (Galet, 1977).

B. cinerea est représenté par un complexe d'espèces proches, divisé en deux groupes phylogénétiques (groupe I et groupe II). Des études récentes minimisent l'influence des souches de *B. cinerea* appartenant au groupe I dans l'épidémiologie de la maladie au vignoble (Giraud *et al.*, 1998), en dépit de leur insensibilité à un fongicide anti-*Botrytis* récent, le fenhexamide (Martinez *et al.*, 2005). L'analyse des marqueurs moléculaires, dans une population de *B. cinerea* issue du vignoble champenois, révèle l'existence de deux types distincts dénommés *vacuma* et *transposa*, appartenant au groupe II (Giraud *et al.*, 1998). Ces deux sous-espèces se distinguent par des dynamiques d'évolution des populations différentes, dont les variations peuvent être liées à leur capacité à se développer sous forme saprophyte ou parasite (virulence), à leur sensibilité aux fongicides et aux réponses adaptatives de ces souches lors des stress environnementaux. La sous-espèce *transposa* semble

physiologiquement plus adaptée que la sous-espèce *vacuma* à développer diverses résistances aux fongicides (Martinez *et al.*, 2005). Cette diversité génétique renforce la complexité des interactions entre la vigne et le pathogène et permet surtout une recombinaison génétique importante du champignon privilégiant ainsi l'apparition des souches de *B. cinerea* résistantes à de nombreux fongicides.

L'évolution de la maladie sur les baies en fin de saison n'est corrélée à aucune quantification de l'inoculum ou de l'expression des symptômes dans les phases épidémiques précoces (avant la véraison, stade d'acquisition de la réceptivité des baies). L'existence de ces deux sous-populations sympatriques de *B. cinerea* pourrait expliquer ce phénomène. Il apparaît, comme en Champagne, une évolution rapide de la répartition des deux sous-populations au cours de la saison, avec une forte présence de *B. vacuma* avant la véraison et sa quasi-disparition à la vendange, au moment où *B. transposa* devient alors majoritaire. L'effet de l'organe hôte est également significatif : deux fois plus de *B. vacuma* sont détectées sur les inflorescences et sur les feuilles par rapport aux baies (Martinez *et al.*, 2005). Les fortes différences observées dans l'évolution temporelle du ratio des deux sous-populations de *B. cinerea* pourraient expliquer l'absence de relations entre les phases épidémiques précoces et tardives (avant et après la véraison). Cette diversité des sous-populations de *Botrytis* pourrait également éclaircir l'existence de deux périodes de contamination différentes des baies qui résultent sur des dépréciations différentes de la plante. Avant la floraison, *B. cinerea* va contaminer les pièces florales et entraîner la chute de l'inflorescence. Puis après la floraison, *B. cinerea* envahit les pièces florales desséchées et demeure quiescent au sein de la grappe jusqu'à la véraison, stade sensible, à partir duquel il se développera parallèlement à la maturation des fruits (Bulit et Lafon, 1977). Cependant, la contamination des baies par *B. cinerea* n'est possible de la nouaison à la véraison que par l'intermédiaire de blessures. L'estimation de la fréquence relative des deux sous-populations à la floraison pourrait alors s'avérer un paramètre épidémiologique déterminant, qui pourrait permettre la mise en place d'un modèle épidémiologique facilitant le contrôle du développement de la maladie qualifié « d'explosif » en fin de saison (Martinez *et al.*, 2005).

2 Lutte chimique contre la pourriture grise

La viticulture est une grande consommatrice de pesticides en France, cette situation tient moins à l'importance des surfaces cultivées (944 000 hectares soit seulement 3,2% des surfaces agricoles utiles) (ONIVINS, 2005), qu'au nombre de traitements phytosanitaires réalisés par unité de surface. Ceux-ci sont considérés comme la solution quasi-unique au

cortège de bioagresseurs de la culture (les fongicides représentent 70 % des dépenses phytosanitaires).

Dans la lutte contre *B. cinerea* chez la vigne, les fongicides sont généralement appliqués, selon une méthode conventionnelle, aux quatre stades phénologiques du développement de la plante reconnus pour être très sensibles aux attaques du champignon (stade A : fin floraison – début de la nouaison ; stade B : fermeture de la grappe : stade C : véraison ; stade D : 3 à 4 semaines avant les vendanges). La plupart des fongicides anti-*Botrytis* utilisés ont une action directe sur le champignon. Les substances actives comme le folpel, le thirame, le fluazinam et le dichlofluanide inhibent la respiration mitochondriale. En altérant la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ou ADN), l'iprodione, le procymidone, le vinchlozoline et le fludioxonil entraînent une instabilité mitotique qui conduit à une perturbation de la croissance des hyphes mycéliens. Le carbendazime, le benomyl et le thiophanate de méthyle sont également capables d'inhiber la synthèse d'ADN et perturbent la réplication et la formation de microtubules. La biosynthèse des stérols est affectée chez le champignon soumis au fenhexamide, quand celle de la méthionine est perturbée suite à l'application du pyriméthanil, du cyprodinil et du mépanipirim (Elad *et al.*, 1992 ; Rosslenbroich et Stuebler, 2000 et ressource informatique : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/ecoacs/3a1279.htm>).

L'épandage massif et répété de certains de ces pesticides chimiques conduit à une pollution de notre environnement. Ainsi, des résidus sont retrouvés dans l'eau, dans les sols et dans les produits finis (Coubart et Reulet, 2000). Dans le cas de la lutte contre *B. cinerea*, certaines souches du vignoble sont connues pour avoir développé une résistance aux produits de la famille des anilo-pyrimidines, des benzimidazoles, des dicarboximides (Rosslenbroich et Stuebler, 2000 ; Leroux *et al.*, 2000 ; 2002). Le développement de souches résistantes aux pesticides chimiques est un phénomène fréquent chez *B. cinerea* et pose un réel problème agronomique. Diverses stratégies anti-résistance sont envisagées. Il est notamment conseillé d'alterner les différents types de pesticide anti-*Botrytis* avec un maximum d'une application annuelle par famille. Néanmoins à l'heure actuelle où les pressions économique, écologique, sanitaire et législative sont de plus en plus fortes, on comprend l'intérêt d'exploiter des moyens de lutte contre *B. cinerea* autres que le recours systématique aux fongicides. L'utilisation de tels produits se trouve donc aujourd'hui remise en cause : impasses chimiques, collectivité soucieuse d'un environnement sain, professionnels de l'agriculture attentifs aux améliorations de leurs conditions de travail, présence de résidus dans les produits finaux... De nombreuses matières actives sont ainsi progressivement retirées du marché

(révision européenne des substances phytosanitaires dans le cadre de la directive 91/414/CE), bien qu'elles laissent des usages non couverts. Ainsi la réglementation en matière de lutte chimique plus restrictive au niveau européen suscite chez les professionnels un intérêt croissant pour des méthodes alternatives de lutte contre les agents pathogènes plus respectueuses de l'environnement et compatible avec les appellations d'origine contrôlée (ou AOC).

Ces méthodes alternatives sont aujourd'hui abordées sous plusieurs angles : 1) la possibilité de substituer aux fongicides de synthèse des préparations biologiquement actives, d'origine généralement naturelle, sans impacts reconnus sur l'environnement ou la santé, pouvant conduire à une réduction ou suppression de produits chimiques sans remettre en cause les pratiques culturales, 2) des perspectives de mettre en œuvre des systèmes culturaux moins vulnérables aux pathogènes, donc moins dépendants des pesticides. Ces systèmes sont donc basés sur l'exploitation des défenses naturelles de la plante et donc sur sa résistance, mais aussi, sur l'inhibition du pouvoir pathogène du champignon.

3 Méthodes alternatives à la lutte chimique

Les alternatives à la protection chimique sont un véritable impératif pour le développement d'une viticulture durable, que ce soit à cause des limites d'efficacité des produits chimiques ou pour des motifs environnementaux et sanitaires. Dans plusieurs régions de France, une des priorités est de développer des alternatives à la lutte chimique qui visent à améliorer la résistance aux pathogènes de la vigne à l'aide de produits biologiques (éliciteurs), par voies génétiques (production d'hybrides ou de plantes transgéniques) ou encore en utilisant des microorganismes de la rhizosphère (lutte biologique). Ces approches sont généralement basées sur l'exploitation des défenses naturelles de la plante.

3.1 Induction des mécanismes de défense des plantes

La résistance de la plante est généralement dépendante de nombreux facteurs impliquant sa réceptivité et la précocité de la mise en place des réactions de défense vis-à-vis du pathogène. Ces réactions sont diverses et impliquent différentes cascades de transduction du signal aboutissant à l'expression de réponses typiques de défense (Figure 1).

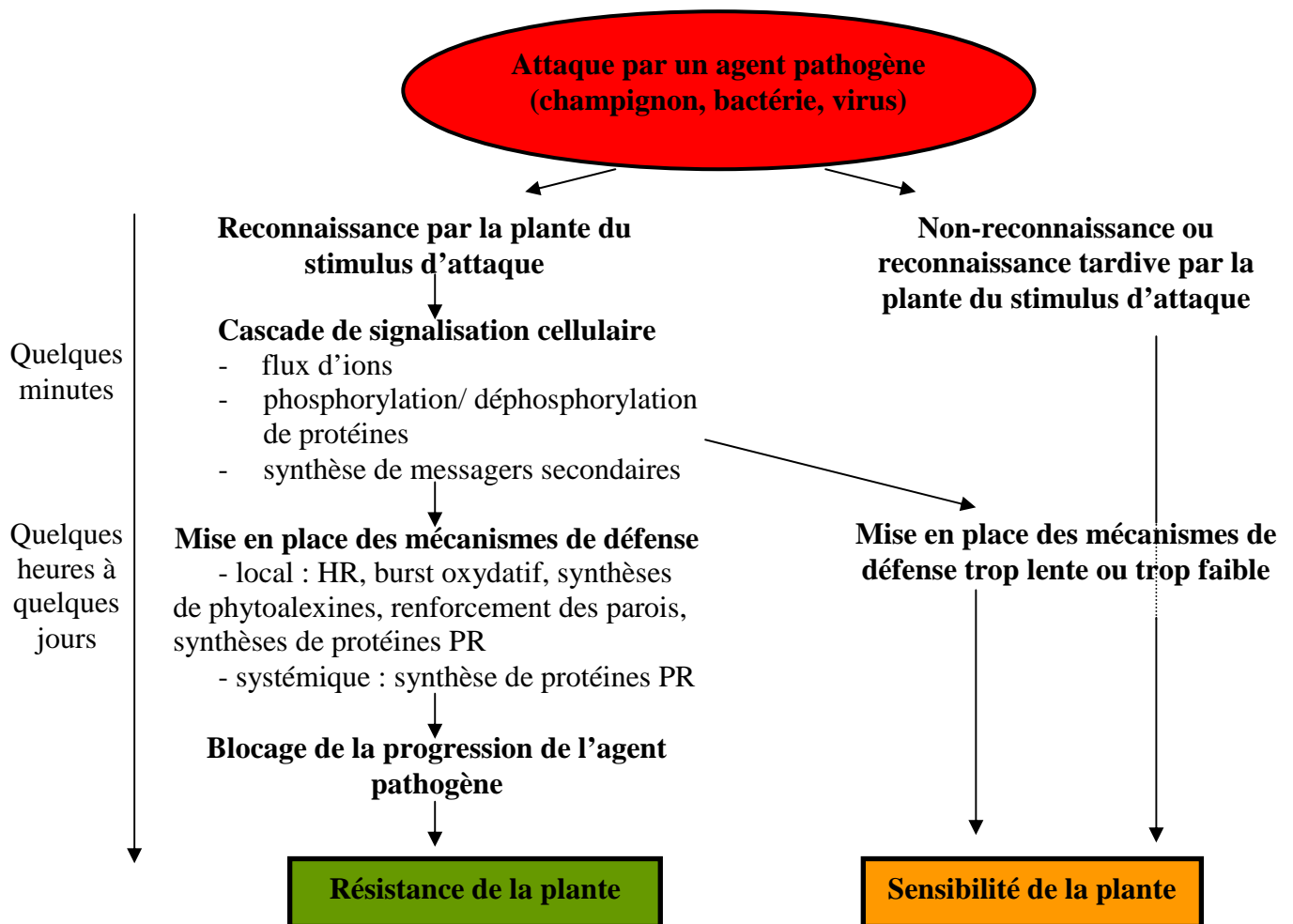


Figure 1 : Schéma général d'induction des réactions de défense chez les plantes (d'après Rajnchapel-Messai, 1988) aboutissant à la résistance ou à la sensibilité vis-à-vis des pathogènes. HR : Réaction d'hypersensibilité, protéines PR : protéines « pathogenesis-related ».

Modification des flux ioniques

Une modification des flux ioniques à travers la membrane plasmique est observée rapidement après l'interaction du microorganisme avec la plante. Ce sont principalement des efflux de potassium (K^+), de chlore (Cl^-), de nitrate (NO_3^-) et des influx de calcium (Ca^{2+}) et de protons (H^+) (Zimmermann *et al.*, 1999) (Figure 2). Ils sont vraisemblablement dus à l'activation de canaux ioniques, qui interviennent dans l'initiation des réactions de défense chez la plante.

Production de Formes Actives de l'Oxygène (FAO)

L'accumulation de FAO ou « burst oxydatif » est l'un des événements le plus rapidement observable chez les plantes soumises à différents pathogènes (bactéries, champignons, virus) (Lamb et Dixon, 1997). La FAO la plus étudiée est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). H_2O_2 est capable d'induire l'expression de nombreux gènes de défense (Mehdy, 1994 ; Tenhaken *et al.*, 1995 ; Green et Fluhr, 1995 ; Wu *et al.*, 1997 ; Aziz *et al.*, 2004). H_2O_2 est impliqué dans le renforcement des parois du végétal (Bradley *et al.*, 1992) et est également susceptible d'inhiber directement la germination des spores de nombreux pathogènes fongiques (Low et Merida, 1996 ; Lamb et Dixon, 1997).

Activation de protéines G

Les protéines G ou « GTP-binding » (GTP pour guanosine triphosphate) sont généralement associées à des récepteurs membranaires, leur régulation joue un rôle majeur dans la perception du stimulus d'attaque (Legendre *et al.*, 1993 ; Mehdy, 1994 ; Vera-Estrella *et al.* 1994). Ces protéines sont impliquées dans l'activation de protéines de défense, l'accumulation de molécules signales et même dans l'inhibition de flux ioniques (Legendre *et al.*, 1992 ; 1993 ; Beffa *et al.*, 1995 ; Kawasaki *et al.*, 1999).

Modifications de la phosphorylation des protéines

Les mécanismes de phosphorylation ou de déphosphorylation des protéines font intervenir des MAPK (pour « mitogen-activated protein kinase ») et des Sérine /Thréonine phosphatases qui sont responsables de l'accumulation de molécules signales et de protéines de défense (Chandra et Low, 1995 ; Jabs *et al.*, 1997 ; Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000 ; Romeis *et al.* 2000 ; Glazebrook, 2001 ; Lee *et al.*, 2001 ; Zhang et Klessig, 2001 ; Kim *et al.*, 2003). Ces événements peuvent aussi être impliqués dans la régulation du burst oxydatif chez les plantes (Chandra et Low, 1995).

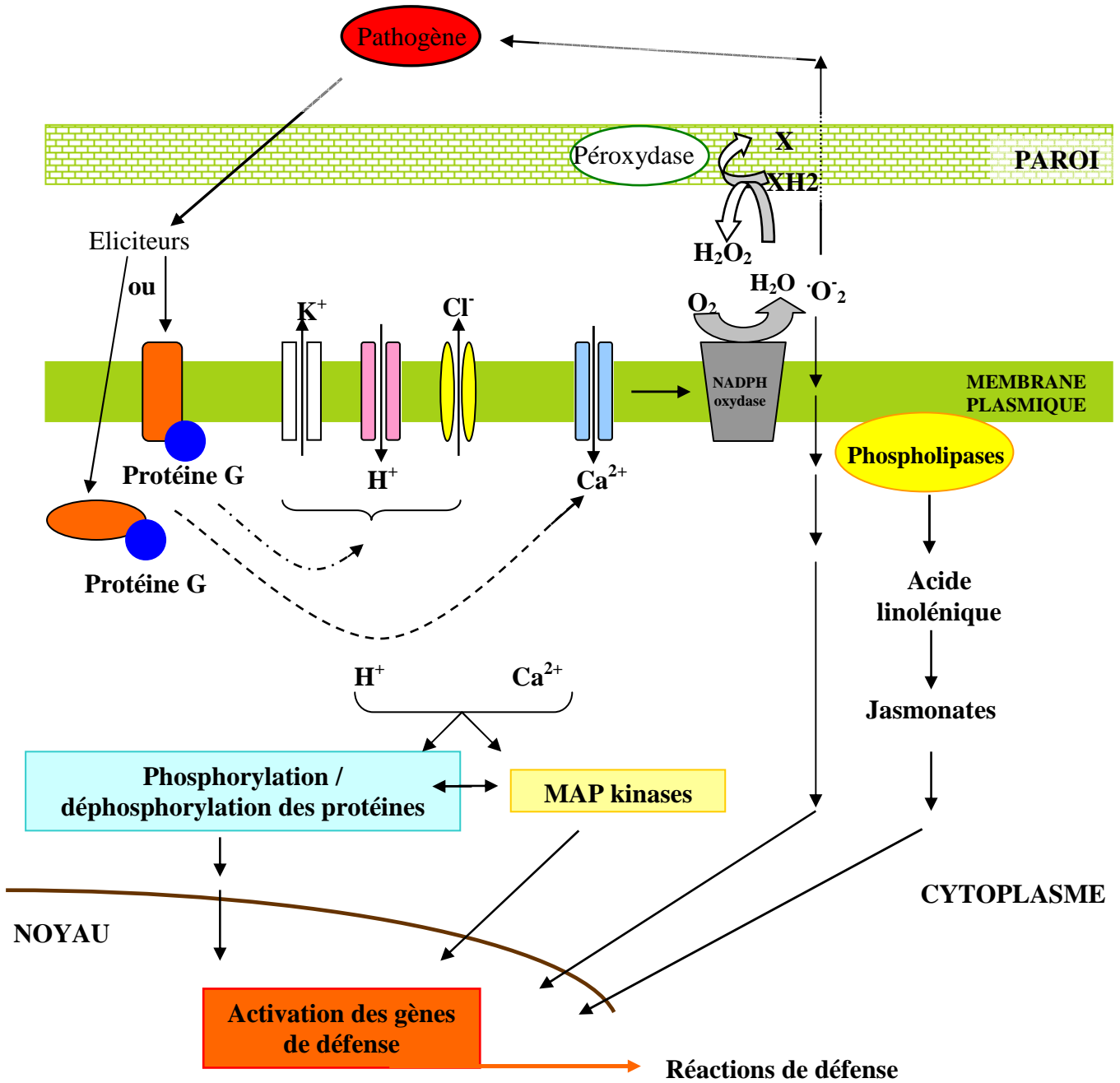


Figure 2 : Représentation schématique des voies de transduction et des mécanismes de défense mis en place suite à l'infection par un agent pathogène (d'après Kombrink et Somssich, 1995). R : Récepteur, X : Composé membranaire donneur d'électrons

Activations de phospholipases

Des activations de phospholipases (les phospholipase A de type 2, C et D) sont observées chez les plantes soumises à des stress biotiques ou à l'application d'éliciteurs (Chandra *et al.*, 1996 ; Munnik *et al.* 1998 ; Van der Luit *et al.* 2000 ; Laxalt *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2004). Les phospholipases hydrolysent les phospholipides membranaires et permettent la libération de composés signaux (lysophospholipide, acide phosphatidique, inositol-1,4,5-triphosphate) (Lee *et al.*, 2001 ; Sang *et al.*, 2001 ; Viehweger *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2004) et des substrats d'enzymes de la voie des lipoxygénases (ou LOX) (Blée, 1998 ; Weber, 2002). Cette voie des LOX ou voie des octadécanoïdes a été principalement étudiée pour son implication dans la production de molécules signales importantes, telles que l'acide jasmonique (ou JA) et le jasmonate de méthyle (ou MeJA), et de composés toxiques (des aldéhydes ou des époxydes) (Croft *et al.*, 1993, Blée, 2002). L'activité LOX est également connue pour être stimulée chez de nombreuses plantes suite à un stress de blessures ou à des stress biotiques (Koch *et al.*, 1992 ; Mueller *et al.*, 1993 ; Conconi *et al.*, 1996).

Métabolites secondaires

Les principales modifications métaboliques qui participent à la lutte contre l'infection, se traduisent généralement par la production de métabolites secondaires (phytoalexines) qui jouent un rôle essentiel dans la lutte contre les pathogènes. Les phytoalexines sont des substances de faible poids moléculaire, plutôt lipophiles dont la synthèse est stimulée chez les végétaux en réponse à différents stress biotiques et abiotiques (Durner et Klessig, 1995 ; Görlach *et al.*, 1995 ; Smith-Becker *et al.*, 1998 ; Morrissey et Osbourn, 1999, Fofana *et al.*, 2002). Ces molécules possèdent un pouvoir inhibiteur sur un large éventail de microorganismes fongiques et bactériens (Morrissey et Osbourn, 1999). La structure biochimique de ces métabolites varie considérablement suivant l'espèce végétale (Hammerschmidt, 1999), mais tous les pathogènes ne manifestent pas la même sensibilité à une phytoalexine donnée (Morrissey et Osbourn, 1999).

D'autres molécules interviennent dans la résistance des plantes aux pathogènes, tels que l'acide salicylique (SA), le JA et l'éthylène, qui sont des phytohormones. De nombreuses études, basées sur l'utilisation de plantes transgéniques de tabac NahG (incapables d'accumuler SA), ont démontrées que SA est un signal intracellulaire important impliqué dans la résistance locale (LAR) ou systémique (SAR), ainsi que dans l'expression des protéines PR pour « pathogenesis-related » (Ryals *et al.*, 1996). Le JA et le MeJA sont aussi

impliqués dans l'induction des protéines de défense (défensines, osmotines, thionines, inhibiteurs de protéases) (Farmer et Ryan, 1992 ; Xu *et al.*, 1994 ; Penninckx *et al.*, 1996). Des mutants d'*Arabidopsis* incapables d'accumuler du jasmonate développent une sensibilité importante à *Pythium mastaphorum* (Vijayan *et al.*, 1998). L'implication de l'éthylène dans l'induction des réactions de défense est confuse. Des plantes mutantes, incapables de produire l'éthylène ou de le percevoir deviennent soit plus résistantes, soit plus sensibles à l'attaque de différents pathogènes en comparaison des plantes sauvages (Hoffman *et al.*, 1999). L'éthylène induit la transcription de gènes de défense (Broglie *et al.*, 1989 ; Eyal *et al.*, 1993, Ohme-Takagi et Shinshi, 1995 ; Deikman, 1997) et stimule la production de composés antifongiques et pariétaux (Graham et Sticklen, 1994). Activée suite à l'application d'un éliciteur fongique, la voie de l'éthylène serait impliquée dans la stimulation de protéines de défense, dont les activités sont fortement corrélées à une réduction des attaques fongiques (Martinez *et al.*, 2001). Le JA, le SA et l'éthylène sont susceptibles de réguler les réponses de défense de la plante, par des interactions synergiques ou antagonistes (Glazebrook, 2001). L'implication de ces molécules dans la signalisation intercellulaire diffère suivant l'espèce végétale et la nature de l'éliciteur.

Renforcement des parois

L'une des réponses les plus courantes chez les plantes suite aux attaques des pathogènes est la formation de nouveaux composants qui viennent renforcer la paroi, tels que les dépôts de polysaccharides, de lignine, de subérine et l'accumulation de protéines riches en hydroxyproline (HRGP) (Benhamou *et al.*, 1996a). La formation de dépôts entre la paroi et la membrane caractérise la formation d'appositions (papilles) et constitue une barrière à la progression des hyphes mycéliens au sein des espaces inter-cellulaires. Celles-ci peuvent être composées de callose, de polyphénols, de pectine, de silice, de calcium et / ou de lignine et des composés antimicrobiens ou même d'enzymes hydrolysantes (Lepoivre, 2003).

Protéines de défense

Les mécanismes de défense de la plante impliquent la synthèse de nombreux peptides et protéines de défense, parmi lesquelles, les protéines PR, initialement découvertes chez le tabac. Les protéines PR ont des propriétés physico-chimiques communes qui leur sont spécifiques : elles sont généralement monomériques, de faible poids moléculaire (8-50 kDa), résistantes à l'action des protéases produites par la plante elle-même ou par les microorganismes pathogènes et stables à faible pH (Stintzi *et al.*, 1993). Ces propriétés leur

confèrent une grande stabilité dans les environnements défavorables où elles s'accumulent, notamment dans la vacuole et dans les espaces intercellulaires colonisés par les agents pathogènes (Fritig *et al.*, 1998; Van Loon et Van Strien, 1999). L'accumulation de ces protéines a été généralisée chez de nombreuses plantes en réponse à l'exposition aux stress biotiques ou abiotiques et sont donc considérées plus généralement comme des protéines de stress (Hammond-Kosack et Jones, 1996; Yun *et al.*, 1996; Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2000). Les protéines PR se distinguent par leurs séquences protéiques, leurs fonctions ou leurs propriétés biologiques. La classification actuelle comprend 17 familles de protéines PR (Tableau I, Van Loon et Van Strien, 1999). L'accumulation de ces protéines ou l'expression de leurs gènes est souvent associée à la LAR et à la SAR (Van Loon et Van Strien, 1999). En outre, leur implication dans la résistance des plantes a été étayée par des approches de transgénèse (Tableau I).

Certaines des protéines PR ont une activité enzymatique identique à celle des β -1,3-glucanases (PR-2) et des chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), enzymes qui dégradent, parfois en synergie, la paroi des champignons et des bactéries pathogènes (Mauch *et al.*, 1988 ; Jach *et al.*, 1995 ; Fritig *et al.*, 1998). D'autres, telles que PR-1 et PR-5 pourraient avoir une action antimicrobienne via leur interaction avec la membrane plasmique du pathogène (Niderman *et al.*, 1995 ; Abad *et al.*, 1996). L'induction de protéines inhibitrices de protéases PR-6 ou (PIN) ou de polygalacturonases (PGIP) microbiennes a également été mise en évidence en réponse aux pathogènes (Cordero *et al.*, 1994 ; De Lorenzo et Ferrari, 2002 ; Valueva et Mosolov, 2004). Ces protéines ont pour rôle de prévenir la dégradation de la paroi végétale en inhibant l'activité hydrolytique d'enzymes microbiennes (Valueva et Mosolov, 2004).

Les chitinases sont réparties en sept classes distinctes définies par homologie de séquences et sur la présence ou l'absence de domaines spécifiques. Elles sont de puissants inhibiteurs de la croissance mycélienne de nombreux champignons (Schlumbaum *et al.*, 1986 ; Derckel *et al.*, 1998a ; 1998b ; Salzman *et al.*, 1998 ; Ano *et al.*, 2003). Les β -1,3-glucanases hydrolysent les polymères de β -1,3-glucanes composant les parois des bactéries et des champignons (Mauch *et al.*, 1988 ; Sela-Buurgale *et al.*, 1993). Associées à leurs actions directes sur les parois du pathogène, les β -1,3-glucanases et les chitinases génèrent la synthèse d'oligomères de glucanes ou de chitine susceptibles d'induire ou d'amplifier les réactions de défense de la plante (Punja et Zhang 1993 ; Fritig *et al.*, 1998).

Tableau I : Classification des protéines PR retrouvées dans le règne végétal. Modifiée d'après Van Loon & Van Strien (1999) et <http://www.bio.uu.nl/~fytopath/PR-families.htm>.

Familles	Type / Fonctions	Observations et références
PR 1	inconnu	- augmentation de la résistance contre <i>Peronospora tabacina</i> et contre <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> chez le tabac (Alexander <i>et al.</i> , 1993)
PR 2	β -1,3-glucanase	- augmentation de la résistance contre <i>Magnaporthe grisea</i> chez le riz (Nishizawa <i>et al.</i> , 2003) - augmentation de la résistance contre <i>Alternaria solani</i> chez la tomate (Schaefer <i>et al.</i> , 2005)
PR 3	chitinase de type I, II, IV, VI et VII	- augmentation de la résistance contre <i>Rhizoctonia solani</i> chez le riz (Datta <i>et al.</i> , 2001) - augmentation de la résistance contre <i>Cercospora arachidicola</i> chez l'arachide (Rohini et Sankara Rao, 2001)
PR 4	« chitin binding protein », antifongique	
PR 5	« thaumatin-like », antifongique	- augmentation de la résistance contre <i>Fusarium graminearum</i> chez le blé (Chen <i>et al.</i> , 1999)
PR 6	inhibiteur de protéases	- augmentation de la résistance des plantes à l'attaque d'insectes, de nématodes et de virus (Johnson <i>et al.</i> , 1989 ; Urwin <i>et al.</i> , 1998 ; Gutierrez-Campos <i>et al.</i> , 1999)
PR 7	endoprotéinase	
PR 8	chitinase de type III	
PR 9	péroxydase	
PR 10	RIP « ribosome-inactivating protein »	- augmentation de la résistance à <i>Rhizoctonia solani</i> chez le tabac (Jach <i>et al.</i> , 1995) - augmentation de la résistance à <i>Pyricularia oryzae</i> chez le riz (Yuan <i>et al.</i> , 2002)
PR 11	chitinase de type V	
PR 12	défensine	- augmentation de la résistance à <i>Alternaria longipes</i> chez le radis (Terras <i>et al.</i> , 1995) - augmentation de la résistance à <i>Verticillium dahliae</i> chez la pomme de terre (Gao <i>et al.</i> , 2000)
PR 13	thionine	- augmentation de la résistance à <i>Fusarium oxysporum</i> et à <i>Plasmopara brassicae</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i> (Epple <i>et al.</i> , 1997 ; Holtorf <i>et al.</i> , 1998)
PR 14	protéines de transfert de lipides (LTP),	- augmentation de la résistance à <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> chez le tabac (Molina et Garcia-Olmedo, 1997)
PR 15	oxalate oxydases	- augmentation de la résistance à <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> chez le tournesol (Hu <i>et al.</i> , 2003)
PR 16	oxalate oxydases-like	
PR 17	inconnu	

3.2 Réactions de défense chez la vigne

Il est bien établi aujourd'hui que la vigne répond aux agressions des pathogènes par la mise en place de réactions de défense variées. Certaines d'entre elles sont constitutives et d'autres sont induites, telles que l'accumulation de tanins, de phytoalexines et de protéines PR.

3.2.1 Défenses constitutives

Lors d'une interaction *B. cinerea* /vigne, le champignon doit franchir la première barrière représentée par la cuticule. Celle-ci est composée d'une couche de cires épicuticulaires, d'une couche de cutine et d'une troisième couche de cires intracellulaires, de cutine et de pectine. La paroi végétale constitue aussi une seconde barrière composée de polymères polysaccharidiques comme la cellulose, la pectine et l'hémicellulose. Celles-ci sont associées à des unités phénoliques, formant ainsi des complexes structuraux importants pour la résistance des tissus végétaux. Le rôle protecteur de la cuticule contre les champignons phytopathogènes semble évident (Heintz et Blaich, 1990). Chez la vigne, l'épaisseur de la cuticule des baies est plus faible chez les grappes dites compactes que chez les grappes aérées. Ces dernières sont considérées comme étant moins réceptives aux infections de *B. cinerea* que les grappes compactes, ainsi la structure de la grappe jouerait un rôle important dans la défense passive contre la pourriture grise (Percival *et al.*, 1994).

Au cours du développement de la vigne, on distingue en général deux stades de sensibilité différente à *B. cinerea*. Un premier stade où les organes reproducteurs sont réfractaires à toutes infections par *B. cinerea*, entre la floraison et la véraison, et un second stade où les baies sont plutôt sensibles au champignon, de la véraison à la maturation (Hill *et al.*, 1981, Comménil, 1995 ; Comménil *et al.*, 1996). Cette conversion de l'état de résistance à l'état de sensibilité des baies est corrélée à de larges modifications ultrastructurales. Il s'agit notamment du ramollissement de la baie, des diminutions de l'épaisseur et des teneurs en cutine, en pectine et en composés lipidiques à activité antifongique (Chardonnet *et al.*, 1994). Cette résistance trouve également son origine dans la présence d'un composé des cires épicuticulaires (de nature lipophile), inhibiteur de la germination des spores de *B. cinerea*, pendant les phases précoces de la formation des baies. Ce composé est absent seulement à partir de la véraison (Comménil *et al.*, 1996).

Par ailleurs, certains dérivés galliques et tanniques (proanthocyanidines) ont aussi une activité antifongique, en particulier contre *Botrytis*. Ces composés sont capables d'inhiber la production d'enzymes hydrolytiques du pathogène et donc de réduire fortement sa virulence (Hill *et al.*, 1981 ; Pezet *et al.*, 1992 ; Goetz *et al.*, 1999). Les tanins retrouvés de façon importante chez les jeunes baies pourraient être impliqués dans l'état de latence du pathogène avant la véraison (Goetz *et al.*, 1999).

3.2.2 Défenses induites par les pathogènes

Au cours de son interaction avec des pathogènes, la vigne est capable d'exprimer de nombreuses réactions de défense, dont les plus connues sont la production de composés renforçant la paroi pectocellulosique, la synthèse de phytoalexines et l'accumulation de protéines PR. L'amplitude de ces réactions est généralement dépendante de l'organe cible, du stade de développement de la plante, des conditions environnementales, mais aussi de la virulence du pathogène (Staples et Mayer, 1995 ; Reuveni et Reuveni, 1998b ; Derckel *et al.*, 1999).

a. Renforcement de la paroi

Parmi les réactions impliquées dans le renforcement de la paroi, la synthèse de la callose, sous le contrôle de la β -1,3-glucane synthase, a été observée lors de l'infection de la vigne par *P. viticola* (agent du mildiou). Toutefois, la signification physiologique de cette réponse et sa relation avec la résistance au pathogène restent controversées. Gindro *et al.* (2003) ont mis en évidence une forte accumulation de callose au niveau des stomates des feuilles chez un cépage résistant à *P. viticola*. A contrario, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'accumulation de la callose et les différents niveaux de résistance de la vigne à *P. viticola* (Kortekamp *et al.*, 1997).

Les tanins et les flavonoïdes semblent aussi être impliqués dans la résistance de la vigne aux pathogènes. En effet, l'accumulation de ces composés est plus importante et rapide chez les cépages résistants, alors qu'elle est plutôt faible et lente chez les cépages sensibles (Dai *et al.*, 1995a ; 1995b ; Kortekamp *et al.*, 1997). D'autres réponses inductibles, telle que l'accumulation d'extensines (appartenant à la famille des HRGP), sont aussi impliquées dans le renforcement de la paroi de la plante (Jackson *et al.*, 2001).

b. Phytoalexines

L'accumulation des phytoalexines est l'une des principales réactions de défense caractérisée chez la vigne lors de son interaction avec différents pathogènes (Tableau II).

Tableau II : Exemples de pathogènes induisant la synthèse de phytoalexines chez *Vitis*.

Pathogènes	Cultivar	Organe étudié	Réponses induites	Références bibliographiques
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i>	feuilles	• accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Langcake et Pryce, 1976
<i>P. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> , <i>Vitis</i> américains hybrides	feuilles	• accumulation de phytoalexines (resvératrol et ϵ -viniférine)	Dercks et Creasy, 1989
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir, Chardonnay et Cabernet Sauvignon	feuilles	• accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Jeandet <i>et al.</i> , 1992
<i>P. viticola</i>	<i>Vitis rupestris</i>	feuilles	• accumulation de flavonoïdes, de lignine et de phytoalexines (resvératrol)	Dai <i>et al.</i> , 1995a
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir, Chardonnay et Gamay	baies	• accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Jeandet <i>et al.</i> , 1995
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Castor <i>V. vinifera</i> cv. Huxelrebe	baies	• accumulation de phytoalexines (resvératrol, ptérostilbène et ϵ -viniférine)	Bavaresco <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Perlette,	baies	• accumulation de phytoalexines (resvératrol et ptérostilbène)	Sarig <i>et al.</i> , 1997
<i>E. necator</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Carinena	baies	• accumulation de phytoalexines (resvératrol et picéïdes)	Romero-Perez <i>et al.</i> , 2001
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	• induction de l'expression du gène <i>STS</i> • accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Bézier, 2003
<i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Aledo	baies	• accumulation de phytoalexines (resvératrol)	Montero <i>et al.</i> , 2003
<i>P. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Solaris <i>V. vinifera</i> cv. Chasselas	feuilles	• accumulation de phytoalexines (resvératrol, ptérostilbènes, δ -viniférine et ϵ -viniférine)	Pezet <i>et al.</i> , 2004
<i>P. viticola</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Chasselas	feuilles	• dépôt de lignine	Hamiduzzaman <i>et al.</i> , 2005a
<i>P. viticola</i> <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Gloire <i>V. vinifera</i> cv. Riesling	feuilles	• induction de l'expression des gènes <i>PAL</i> , <i>CHS</i> , <i>CHI</i> , <i>STS</i> • accumulation de composés phénoliques	Kortekamp, 2006

Les principales phytoalexines de la vigne sont des composés phénoliques de faible masse moléculaire ayant un large spectre d'activité antifongique et antibactérien (Kuc, 1995 ; Hammerschmidt, 1999 ; Jeandet *et al.*, 2002). Les formes les plus abondantes sont le *trans*-resvératrol (trihydroxy-3, 5, 4'-stilbène) et ses dérivés, le ptérostilbène (diméthoxy-3,5-hydroxy-4'-stilbène), les viniférines (ϵ , δ) et les picéides (resvératrol glucosylé). La production des phytoalexines est liée à l'activation de la voie des phénylpropanoïdes, dont les enzymes clefs sont la phénylalanine ammonia lyase (PAL) et la stilbène synthase (STS) (Figure 3).

Des études ont permis de mettre en évidence une relation entre l'augmentation des teneurs en resvératrol et en ϵ -viniférine et la tolérance des plants de vigne à *B. cinerea*, à *P. viticola* mais aussi à *Phomopsis viticola* (Langcake, 1981 ; Dercks et Creasy, 1989 ; Hoos et Blaich, 1990 ; Keller *et al.*, 2003 ; Pezet *et al.*, 2004). Ces composés sont fortement accumulés et de manière plus précoce chez les cépages les plus résistants (hybrides interspécifiques, espèces américaines comme *Vitis rupestris*) que chez les cépages sensibles (*Vitis vinifera*) (Langcake et Pryce, 1977 ; Langcake *et al.*, 1979 ; Breuil *et al.*, 1998 ; Jeandet *et al.*, 2002).

Le resvératrol est capable d'inhiber la germination des spores et la croissance mycélienne de *B. cinerea* et de *Rhizopus stolonifer* ainsi que la mobilité des zoospores de *P. viticola* (Adrian *et al.*, 1997 ; Sarig *et al.*, 1997 ; Ben-Arie *et al.*, 1999 ; Pezet *et al.*, 2004). L'importance du resvératrol dans la défense des plantes a été démontrée *in planta* par l'insertion et la surexpression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse de ce composé. Ainsi Coutos-Thévenot *et al.* (2001) ont montré qu'une vigne transgénique, exprimant fortement le gène de la STS, présente une tolérance vis-à-vis de *B. cinerea*. De même, l'introduction du gène codant pour la STS issue de la vigne chez le tabac, le riz, le blé et l'orge se traduit par une résistance de ces plantes à *B. cinerea* et à *Pyricularia oryzae* (Hain *et al.*, 1993 ; Stark-Lorenzen *et al.*, 1997 ; Leckband et Lörz, 1998).

c. Protéines de défense

Depuis ces dix dernières années, plusieurs travaux relatent l'accumulation de protéines de défense ou l'expression des gènes correspondant chez la vigne. La majorité de ces protéines sont des protéines PR, en particulier celles qui correspondent aux chitinases (de classe I, III et IV), β -1,3-glucanases (PR-2), peroxydases (PR-9), « thaumatin-like » ou osmotines (PR-5), « ribonuclease-like » ou RIP (PR-10), une LTP (PR-14), un inhibiteur de protéase (PR-6) et une PR-1 (Tableau III).

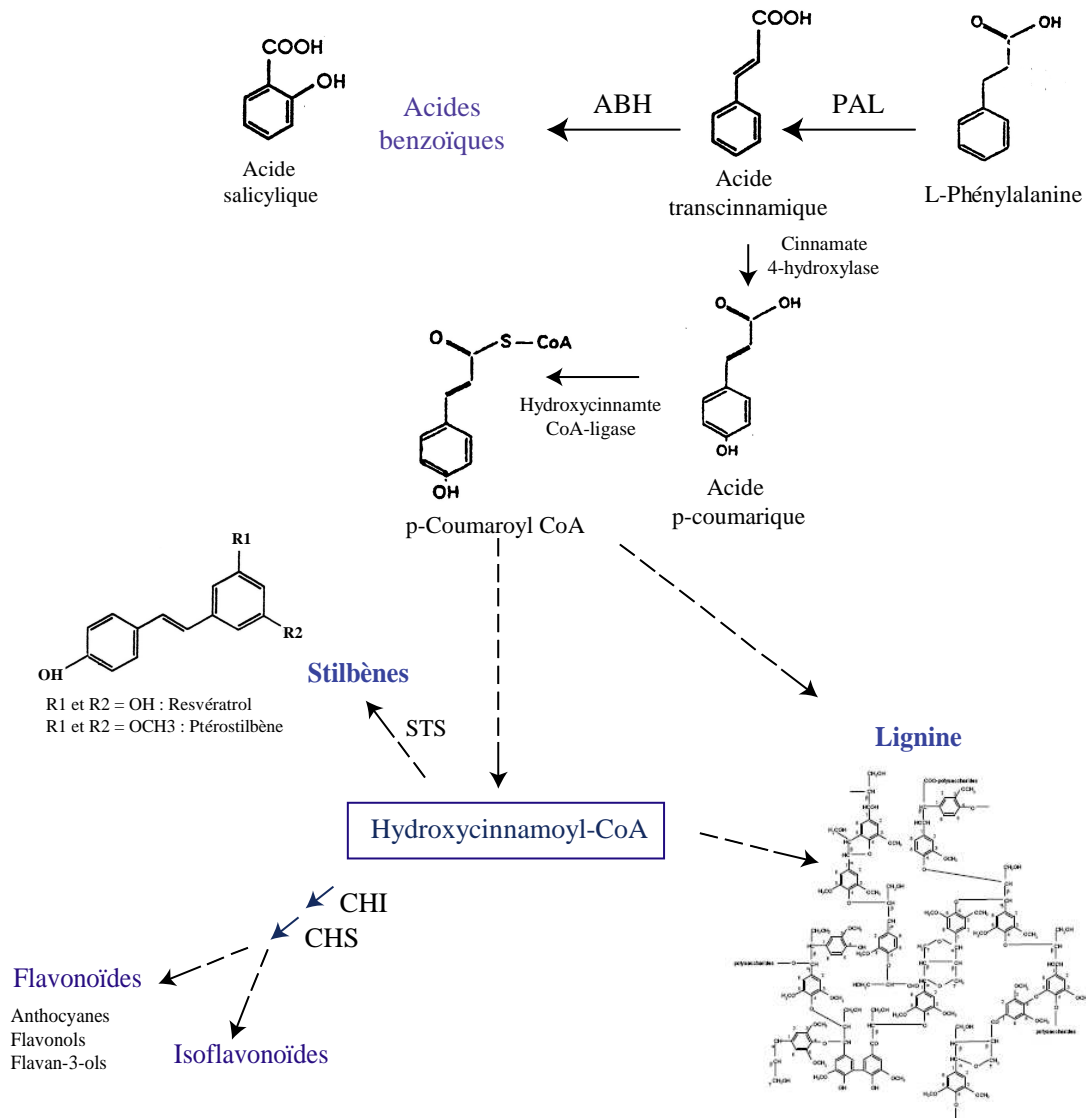


Figure 3 : Voie des phénylpropanoïdes chez les plantes. ABH : acide benzoïque 2-hydroxylase, CHI : chalcone isomérase, CHS : chalcone synthase, PAL : phénylalanine ammonia lyase, STS : stilbène synthase, CoA : coenzyme A.

L'étude concernant les chitinases de vigne a débuté par la mesure de leur activité dans les feuilles (Derckel *et al.*, 1996 ; 1999) et a permis de mettre en évidence 13 isoformes de chitinases, dont six sont constitutives et trois autres sont induites par *B. cinerea*. Les études relatives à l'expression des gènes de chitinases ont révélé une forte induction de chitinase (classes I, III et IV) dans les feuilles de vigne infectées par *P. viticola* ou *E. necator* (Busam *et al.*, 1997 ; Jacobs *et al.*, 1999), ou encore par *B. cinerea* et par la bactérie *Pseudomonas syringae* (Robert *et al.*, 2001 ; 2002 ; Bézier *et al.*, 2002). Ces protéines PR sont également accumulées au niveau de la pulpe des baies (Derckel *et al.*, 1998b). Bien qu'aucune activité chitinase ne soit détectée dans les baies vertes, l'induction de leur expression y est observable en réponse aux attaques d'*E. necator*, de *B. cinerea* ou de *P. syringae* pv. *pisi* (Jacobs *et al.*, 1999 ; Robert *et al.*, 2002). D'après Pocock *et al.* (2000), les niveaux d'induction des protéines PR dans les baies en cours de maturation diffèrent d'un cépage à l'autre et pourraient expliquer la différence de sensibilité ou de résistance de ces cépages.

Des β -1,3-glucanases de vigne ont également été caractérisées par immuno-détection dans les feuilles infectées par *B. cinerea* (Renault *et al.*, 1996). Cependant, il a été rapporté qu'aucune activité β -1,3-glucanase n'a été détectée dans les baies de raisin quel que soit leur stade de développement (Robinson *et al.*, 1997 ; Derckel *et al.*, 1998 b). Des approches moléculaires ont permis d'identifier différents gènes codant pour la β -1,3-glucanase dans les feuilles et/ ou dans les baies de vigne suite à l'infection par *E. necator* ou par *B. cinerea* (Jacobs *et al.*, 1999 ; Bézier *et al.*, 2002 ; Bézier, 2003).

Des protéines PR-1, PR-5 (osmotine ou thaumatine-like), PR-10 et PR-14 (LTP) ont également été mises en évidence chez la vigne en réponse à l'infection par *E. necator* et *B. cinerea* (Salzman *et al.*, 1998 ; Gomès *et al.*, 2003 ; Manteau *et al.*, 2003 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005a ; Kortekamp, 2006). D'autres protéines de défense, comme les PGIP ont également été caractérisées chez la vigne (Joubert *et al.*, 2006). L'expression du gène *PGIP* est observée chez les feuilles ou les cultures cellulaires de vigne en réponse à *P. viticola* (Kortekamp, 2006) et à *B. cinerea* (Bézier *et al.*, 2002). L'insertion et la surexpression du gène *PGIP* issu de la vigne dans les plants de tabac sont même associées à une résistance vis-à-vis de *B. cinerea* (Joubert *et al.*, 2006).

3.3 Eliciteurs des réactions de défense

Cette stratégie vise à stimuler les défenses naturelles de la vigne par l'utilisation de composés éliciteurs chimiques ou dérivés d'organismes pathogènes, de plantes supérieures ou

Tableau III : Expression ou accumulation de protéines PR (ou de gènes) chez *Vitis* lors de son interaction avec différents pathogènes.

Protéines PR	Cultivar	Organe étudié	Pathogènes	Références bibliographiques
• stimulation de l'activité peroxydase (PR-9)	<i>V. rupestris</i>	feuilles	<i>P. viticola</i>	Dai <i>et al.</i> , 1995a
• accumulation de β -1,3-glucanases	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<i>B. cinerea</i>	Renault <i>et al.</i> , 1996
• induction de l'expression des gènes de chitinases	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir <i>V. rupestris</i>	feuilles cellules	<i>P. viticola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Busam <i>et al.</i> , 1997
• accumulation de chitinases et de β -1,3-glucanases	<i>V. vinifera</i> et <i>Vitis</i> américaines hybrides	feuilles	<i>E. necator</i>	Giannakis <i>et al.</i> , 1998
• stimulation des activités β -1,3-glucanases et peroxydases	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet sauvignon	feuilles	<i>P. viticola</i>	Reuveni et Reuveni, 1998b
• accumulation de chitinases et de β -1,3-glucanases	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<i>B. cinerea</i>	Derckel <i>et al.</i> , 1999
• accumulation de chitinases, de β -1,3-glucanases et de thaumatin-like	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon, Sémillon, Shiraz, Sultana	feuilles baies	<i>E. necator</i> , <i>P. viticola</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 1999
• accumulation de β -1,3-glucanases	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<i>B. cinerea</i>	Renault <i>et al.</i> , 2000
• accumulation de PR-1	<i>V. vinifera</i> cv. Limberger	feuilles cellules	<i>E. necator</i> ,	Repka <i>et al.</i> , 2000
• accumulation de PR-10	<i>V. vinifera</i> cv. Ugni blanc	feuilles	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Robert <i>et al.</i> , 2001
• induction de l'expression des gènes de chitinases	<i>V. vinifera</i> cv. Ugni blanc, Chardonnay	feuilles baies	<i>B. cinerea</i> , <i>E. necator</i> , <i>P. viticola</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	Robert <i>et al.</i> , 2002
• induction de l'expression des gènes de chitinase (VCH3) et (VCHIT1b)	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay <i>V. vinifera</i> cv Pinot noir	feuilles baies	<i>B. cinerea</i>	Bézier <i>et al.</i> , 2002
• induction de l'expression des gènes de chitinase (VvChi4C), de β -1,3-glucanase (VvGluc) et d'inhibiteur de protéase (VvPR6)	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<i>B. cinerea</i>	Bézier, 2003
• induction de l'expression des gènes de PR-1 et chitinase (PR-4)	<i>V. vinifera</i> cv. Chasselas	feuilles	<i>P. viticola</i>	Hamiduzzaman <i>et al.</i> , 2005a
• induction de l'expression des gènes de PR-1, chitinases et de β -1,3-glucanases	<i>V. vinifera</i> cv. Chasselas	feuilles	<i>E. necator</i> , <i>P. viticola</i>	Hamiduzzaman, 2005b
• induction de l'expression des gènes de chitinases, de β -1,3-glucanases, de thaumatin-like (PR-5), de PR-10	<i>V. vinifera</i> cv. Gloire <i>V. vinifera</i> cv. Riesling	feuilles	<i>P. viticola</i> , <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Kortekamp, 2006

d'algues marines. Ces composés sont généralement dépourvus de toute toxicité directe sur les parasites. Ils sont capables d'induire au moins une partie des réactions de défense chez les plantes (Oostendoorp *et al.*, 2001). Leur reconnaissance par la plante est qualifiée de non-spécifique et donc ils permettent de lutter contre une large gamme de pathogènes. Chez la vigne, plusieurs molécules à caractère éliciteur ont été caractérisées chez différents modèles (cellules, feuilles, baies) (Tableau IV). Les premières applications dans ce domaine concernaient le développement d'un analogue du SA, l'acibenzolar-S-méthyl (ou BTH) commercialisé sous le nom de Bion® en Europe et homologué contre l'oïdium du blé et le mildiou du tabac, sous le nom d'Actigard® aux USA, pour lutter contre divers mildious de crucifères. Ce produit n'a aucune activité antimicrobienne *in vitro* et stimule des réactions de défense de la plante (Oostendoorp *et al.*, 2001). Lorsque le produit est appliqué seul et de façon préventive, le niveau de protection assuré est partiel et les meilleurs résultats sont obtenus contre le mildiou de tabac lorsque le BTH est associé à un fongicide à faible dose, comme c'est le cas pour Bion Mx®. Ce produit est une association de Mefenoxam et de BTH. Chez la vigne, le BTH s'avère efficace en terme d'induction de la résistance vis-à-vis de l'agent du mildiou chez trois cépages (Carmenere, Chardonnay et Merlot) (Campbell et Latorre, 2004 ; Riches et Holmes, 2005).

D'autres produits, comme l'acide β -3-amino-n-butyrique (BABA) a fait preuve de nombreuses démonstrations, en particulier chez la vigne tant sur le plan de son implication dans l'induction et l'amplification de l'expression de certaines réactions de défense, que sur le plan de la protection contre différents pathogènes (Cohen *et al.*, 1999 ; Zimmerli *et al.* ; 2000, Oostendoorp *et al.*, 2001 ; Reuveni *et al.*, 2001 ; Zimmerli *et al.*, 2001 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005a ; Hamiduzzaman, 2005b). C'est aussi le cas pour le JA et le SA, connus pour être des molécules signales chez les plantes, qui conduisent à l'expression de nombreuses réactions de défense comme l'accumulation des phytoalexines, des anthocyanines, de callose et des protéines PR (Derckel *et al.*, 1996 ; 1998b ; Renault *et al.*, 1996 ; Curtin *et al.*, 2003 ; Hamiduzzaman, 2005b ; Tassoni *et al.*, 2005).

L'utilisation d'oligosaccharides issus de parois d'algues marines, de plantes supérieures ou de microorganismes, tels que les β -glucanes (Potin *et al.*, 1999 ; Klarzynski *et al.*, 2000 ; Aziz *et al.*, 2003), les α -1,4-oligogalacturonides (OGA) (Côté et Hahn, 1994 ; Reymond *et al.*, 1995 ; Aziz *et al.*, 2004 ; D'Ovidio *et al.*, 2004), les carraghénanes (Potin *et al.*, 1999), les fucanes (Klarzynski *et al.*, 2003), les oligomères de chitine et de chitosan (Rabéa *et al.*, 2003)

Tableau IV : Principales molécules et stress abiotiques induisant l'activation des gènes de défense, l'accumulation de protéines PR ou de phytoalexines chez la vigne.

Type d'éliciteur	Cultivar	Organe étudié	Réponses induites	Références
AS	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	• accumulation de β -1,3-glucanases	Renault <i>et al.</i> , 1996
blessure, AS	<i>V. vinifera</i>	feuilles, racines, baies, sarments	• accumulation de chitinases (distinction de 13 isoformes)	Derckel <i>et al.</i> , 1996
blessure, AS	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir	baies	• accumulation et stimulation des activités chitinases et β -1,3-glucanases	Derckel <i>et al.</i> , 1998a et b
blessure, AS	<i>V. vinifera</i> cv. Gamay	cellules	• induction de l'expression d'un gène de β -1,3-glucanase	Kraeva <i>et al.</i> , 1998
blessure, éthylène	<i>V. vinifera</i> et <i>Vitis</i> américaines hybrides	feuilles	• accumulation de chitinases et de β -1,3-glucanases	Giannakis <i>et al.</i> , 1998
éthylène	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet sauvignon, Sémillon, Shiraz, Sultana	feuilles baies	• accumulation de chitinases, de β -1,3-glucanases et de thaumatin-like	Jacobs <i>et al.</i> , 1999
MeJA	<i>V. vinifera</i> cv. Gamay Fréaux var. Tavernier <i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon	cellules	• accumulation de phytoalexines	Krisa <i>et al.</i> , 1999
MeJA	<i>V. vinifera</i> cv. Limberger	feuilles	• stimulation de l'activité peroxydase et accumulation de la protéine • induction locale et systémique de l'expression des gènes de β -1,3-glucanase et de peroxydase • synthèse de SA	Repka <i>et al.</i> , 2001b
Me JA	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon	feuilles	• induction de l'expression des gènes de chitinase (PR-4), β -1,3-glucanase, de PGIP, PIN, de PAL et de STS • accumulation de phytoalexines	Belhadj <i>et al.</i> , 2006
Jasmonates, Na-orthovanadate	<i>V. vinifera</i> cv. Barbera	cellules	• accumulation de phytoalexines	Tassoni <i>et al.</i> , 2005
JA, ABA, BTH, blessures	<i>V. vinifera</i> cv. Chasselas	feuilles	• induction de l'expression des gènes de <i>PR-1</i> , chitinase (<i>PR-4</i>) et de β -1,3-glucanase	Hamiduzzaman, 2005b
JA, ABA, BTH,	<i>V. vinifera</i> cv. Chasselas	feuilles	• induction de l'expression des gènes de <i>PR-1</i> , chitinase (<i>PR-4</i>), <i>LOX-9</i> • dépôt de callose et de lignine	Hamiduzzaman <i>et al.</i> , 2005a
ABA, éthylène, NaCl	<i>V. vinifera</i> cv. Sultana	cellules	• induction de l'expression d'un gène de <i>PR-5</i>	Loulakakis, 1997
BHT	<i>V. vinifera</i> cv. Merlot	baies	• accumulation de phytoalexines et d'anthocyanines	Iriti <i>et al.</i> , 2004
Me JA, UV	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon	feuilles baies	• accumulation de phytoalexines	Larronde <i>et al.</i> , 2003
UV	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon	feuilles	• accumulation de phytoalexines	Langcake et Pryce, 1977
UV	<i>V. vinifera</i> cv. Gamaret, cv. Gamay, cv. Early superior, cv. Perlette, cv. Pinot, cv. Shasla, cv. Spring Blush, cv. Superior, cv. Thompson seedless	baies	• accumulation de phytoalexines	Sarig <i>et al.</i> , 1997
UV	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay <i>V. vinifera</i> cv. Gamay <i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir	baies	• accumulation de phytoalexines	Adrian <i>et al.</i> , 2000
UV	<i>V. vinifera</i> cv. Cabernet Sauvignon, cv. Chardonnay, cv. Sémillon, cv. Shiraz	baies	• accumulation de phytoalexines • induction de l'expression des gènes de la PAL et de la STS	Bais <i>et al.</i> , 2000

Type d'éliciteur	Cultivar	Organe étudié	Réponses induites	Références
UV	<i>V. rupestris</i> <i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay <i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir	feuilles	<ul style="list-style-type: none"> induction de l'expression des gènes de chitinase, de β-1,3-glucanase, PR-6, PR-10, PAL et de STS stimulation des activités chitinase et β-1,3-glucanase accumulation de phytoalexines 	Bonomelli <i>et al.</i> , 2004 Borie <i>et al.</i> , 2004
INA, BTH, extrait de levure	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir <i>V. rupestris</i>	feuilles cellules	<ul style="list-style-type: none"> induction de l'expression des gènes de chitinase : <i>VCH3</i> et <i>VCHIT1b</i> 	Busam <i>et al.</i> , 1997
AS, MeJA, chitosan, éliciteur de <i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Limberger	feuilles cellules	<ul style="list-style-type: none"> accumulation de PR-1 	Repka <i>et al.</i> , 2000
AS, MeJA, chitosan, éliciteur de <i>B. cinerea</i>	<i>V. vinifera</i> cv. Limberger	cellules	<ul style="list-style-type: none"> induction de gènes et accumulation de PR-1, chitinase, β-1,3-glucanase et de peroxydase 	Repka, 2001a
éliciteurs de <i>B. cinerea</i> (glucane)	<i>V. vinifera</i> cv. Optima	cellules	<ul style="list-style-type: none"> stimulation de l'activité de la PAL, de la STS et de la cinnamate hydroxylase accumulation de STS et de phytoalexines (resvératrol) 	Liswidowati <i>et al.</i> , 1991
endopolygalacturonase (<i>B. cinerea</i>)	<i>V. vinifera</i> cv. Gamay	cellules	<ul style="list-style-type: none"> induction de β-1,3-glucanases 	Poinssot <i>et al.</i> , 2003
β -1,3-glucanes (laminarine)	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	cellules	<ul style="list-style-type: none"> influx de Ca^{2+}, formation de FAO induction de l'expression des gènes <i>PAL</i>, <i>LOX</i>, <i>GST</i>, <i>STS1</i>, <i>PGIP</i>, <i>CHIT1b</i>, <i>CHIT3</i>, <i>CHIT4c</i>, <i>GLU1</i>, <i>PIN</i> stimulation des activités chitinase et β-1,3-glucanase accumulation de phytoalexines 	Aziz <i>et al.</i> , 2003
OGA	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	cellules	<ul style="list-style-type: none"> formation de FAO induction de l'expression des gènes <i>PAL</i>, <i>GST</i>, <i>STS1</i>, <i>PGIP</i>, <i>CHIT1b</i>, <i>CHIT3</i>, <i>CHIT4c</i>, β<i>GLU1</i>, <i>PIN</i> stimulation des activités chitinase et de β-1,3-glucanase 	Aziz <i>et al.</i> , 2004
Chitosan, cuivre	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<ul style="list-style-type: none"> stimulation des activités chitinase et β-1,3-glucanase accumulation de phytoalexines 	Aziz <i>et al.</i> , 2006
Chitosan	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	feuilles	<ul style="list-style-type: none"> stimulation des activités chitinase, lipoxigénase et PAL 	Trotel-Aziz <i>et al.</i> , 2006
Ergostérol	<i>V. vinifera</i> cv. Ugni blanc	cellules	<ul style="list-style-type: none"> induction de l'expression des gènes <i>VvLTP1</i> (PR-14), <i>WwWRKY1</i> (MAPK), <i>VST1</i> (stilbene synthase) accumulation de phytoalexines 	Laquitaine <i>et al.</i> , 2006
Cellodextrines	<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay	cellules	<ul style="list-style-type: none"> influx de Ca^{2+}, formation de FAO, induction de l'expression des gènes <i>PAL</i>, <i>STS</i>, <i>PGIP</i>, <i>CHIT1b</i>, <i>CHIT3</i>, <i>CHIT4c</i>, β-<i>GLU1</i>, <i>PIN</i> stimulation des activités chitinase et de β-1,3-glucanase 	Aziz <i>et al.</i> , 2007
Cyclodextrines	<i>V. vinifera</i> cv. Gamay	cellules	<ul style="list-style-type: none"> accumulation de phytoalexines stimulation de l'activité peroxydase et accumulation de certains isoformes de la protéine 	Bru <i>et al.</i> , 2006
Brotomax ®	<i>V. vinifera</i> cv. Chasselas	feuilles	<ul style="list-style-type: none"> stimulation des activités chitinase et β-1,3-glucanase 	Riches et Holmes, 2005

a aussi suscité un grand intérêt suite aux travaux réalisés sur les constituants saccharidiques et chitineux de microorganismes. Chez la vigne, certains de ces oligosaccharides sont capables d'induire l'activation de réponses variées (le burst oxydatif, l'activation de MAPK, l'influx de Ca^{2+} , l'alcalinisation du milieu, l'expression des gènes de défense et l'accumulation de protéines PR) (Aziz *et al.*, 2003, 2004 ; 2006 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2006 ; Aziz *et al.*, 2007). Dans des conditions de laboratoire, l'induction de ces réactions est corrélée à une résistance des feuilles de vignes à *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2004 ; Ait Barka *et al.*, 2004 ; Aziz *et al.*, 2006 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2006 ; Aziz *et al.*, 2007) et à *P. viticola* (Aziz *et al.*, 2003 ; 2006). L'application de certaines de ces molécules au vignoble montre néanmoins une efficacité partielle en terme de protection contre ces pathogènes (Riches et Holmes, 2005). Des réactions de défense similaires sont aussi observées chez la vigne en réponse aux UV (Adrian *et al.*, 2000 ; Bais *et al.*, 2000 ; Bonomelli *et al.* 2004 ; Borie *et al.*, 2004). Des études réalisées sur des cépages de sensibilités différentes ont montré que l'amplitude de ces réactions de défenses est souvent associée à une résistance accrue aux pathogènes (Giannakis *et al.*, 1998 ; Reuveni et Reuveni, 1998b ; Bonomelli *et al.*, 2004).

D'autres composés chimiques ont obtenus une homologation pour leur application au vignoble : il s'agit du foséthyl d'aluminium (*Aliette*®), du trichlorure d'aluminium déshydraté (*Synermix*®), du bicarbonate de potassium (*Ecocarb*®) ainsi que du *Brotomax*® composé d'azote, de cuivre de manganèse et de zinc. Ces composés induisent une protection des feuilles de vigne contre l'agent du mildiou (Dercks et Creasy, 1989 ; Reuveni *et al.*, 2001 ; Riches et Holmes, 2005) en stimulant certaines réactions de défense (expression de gènes de défense, formation de tyloses et accumulation de composés phénoliques) (Del Rio *et al.*, 2001 ; Bonomelli, 2003).

3.4 Amélioration de la résistance de la vigne par transformation génétique

La surexpression de composés antimicrobiens comme les phytoalexines ou les protéines PR contribue à diminuer la réceptivité de la plante aux pathogènes fongiques variés (Perl *et al.*, 1996 ; Yamamoto *et al.*, 2000 ; Coutos-Thévenot *et al.*, 2001 ; Bornhoff *et al.*, 2005). L'expression constitutive d'enzymes permettant de détoxifier des toxines fongiques est une stratégie importante, qui a notamment permis d'obtenir une résistance des cellules de vigne contre *E. lata*. En effet, la tolérance de la vigne à la maladie découle de la forte capacité de la

plante à réduire la toxine eutypine en un composé inactif : l'eutypinol, *via* l'action d'une NADPH-dépendante aldéhyde réductase issue de *Vigna radiata* (Guillen *et al.*, 1998).

Les recherches sur les vignes transgéniques concernent également la lutte contre les virus et particulièrement contre le GFLV (« grapevine fanleaf virus »). Une fois introduit dans le génome du porte-greffe, c'est l'expression du gène codant pour la protéine de la capsid de GFLV qui va perturber le développement du virus au sein de la plante (Mauro *et al.*, 1995 ; Vigne *et al.*, 2004).

La profession viticole est pour l'instant très réticente vis-à-vis de l'introduction de gènes de résistance dans la vigne que ce soit par transgénèse ou par hybridation. En outre ces méthodes sont de longue haleine avec le risque que les sélections soient substantiellement différentes des cépages actuels. L'amélioration variétale de la vigne par transformation génétique reste pour l'instant incompatible avec les AOC.

3.5 Lutte biologique

La lutte biologique consiste en l'utilisation d'organismes vivants ou de produits issus de ces organismes pour limiter ou réduire les pertes ou les dommages causés par les organismes nuisibles (OILB, Organisation Internationale de Lutte Biologique). L'utilisation de microorganismes fait partie des alternatives prometteuses à l'emploi des fongicides chimiques, de part l'ubiquité de ces microorganismes, leur grande diversité et leur dissémination dans les sols rhizosphériques (Chen *et al.*, 1995 ; Benhamou *et al.*, 1996 b ; Berg *et al.*, 2005).

3.5.1 Diversité des agents de la lutte biologique

Compte tenu de la diversité des plantes hôtes de *B. cinerea*, de nombreux travaux ont porté sur la caractérisation de différents agents de la lutte biologique capables de lutter contre ce champignon. Ces agents sont principalement représentés par des bactéries et des champignons non pathogènes, capables de confiner le développement de *B. cinerea* chez les plantes (Tableau V). De nombreuses bactéries ont été isolées à partir de la rhizosphère et sont qualifiées de PGPR pour «*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* » (Kloepper et Schroth, 1978). La rhizosphère est le lieu d'une intense vie microbienne, fortement dépendante de l'effet et de la nature des exsudats racinaires de la plante (sucres, acides aminés, acides organiques...). Les communautés microbiennes, qu'elles soient endophytiques ou épiphytiques, sont dépendantes de l'espèce végétale et des facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement (Germida *et al.*, 1998) (Figure 4). Certaines bactéries sont aussi impliquées

Tableau V: Diversité des agents de lutte biologique contre *B. cinerea* chez différentes espèces végétales.

	Agents biologiques	Plantes Hôtes	Références
Bactéries	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tomate, poire	Mari <i>et al.</i> , 1996
	<i>Bacillus mycoides</i>	Fraisier	Guetsky <i>et al.</i> , 2002a, b
	<i>Bacillus pumilus</i>	Haricot, poire, tomate, concombre	Elad <i>et al.</i> , 1994a, b ; Mari <i>et al.</i> , 1996 ; Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Bacillus subtilis</i>	Tomate	Utkhede <i>et al.</i> , 2001
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Tomate	Utkhede <i>et al.</i> , 2001
	<i>Pantoea agglomerans</i>	Poire	Nunes <i>et al.</i> , 2001
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Haricot	De Meyer et Höfte, 1997
	<i>Pseudomonas putida</i>	Tomate, haricot	Ongena <i>et al.</i> , 2002 ; Meziane <i>et al.</i> , 2005
	<i>Serratia marcescens</i>	Cyclamen	Someya <i>et al.</i> , 2001
	<i>Serratia plymuthica</i>	Melon	Kamensky <i>et al.</i> , 2003
	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Tomate	Elad <i>et al.</i> , 1994a, b
Champignons	<i>Acremonium cephalosporium</i>	Vigne (raisin)	Zahavi <i>et al.</i> , 2000
	<i>Aspergillus giganteus</i>	Géranium	Moreno <i>et al.</i> , 2003
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Tomate, concombre, vigne (raisin), pomme	Dik <i>et al.</i> , 1999; Castoria <i>et al.</i> , 2001
	<i>Candida guilliermondii</i>	Vigne (raisin), Tomate	Zahavi <i>et al.</i> , 2000 ; Saligkarias <i>et al.</i> , 2002
	<i>Candida oleophila</i>	Tomate	Saligkarias <i>et al.</i> , 2002
	<i>Candida saitoana</i>	Pomme	El-Ghaouth <i>et al.</i> , 1998
	<i>Chaetomium globosum</i>	Tomate, concombre	Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Clonostachys rosea</i>	Rosier	Morandi <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cryptococcus luteus</i>	Tomate, concombre	Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Cryptococcus albidus</i>	Tomate, concombre	Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Cryptococcus laurentii</i> var. <i>flavescens</i>	Tomate, concombre	Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Haricot, tomate, concombre	Elad <i>et al.</i> , 1994b ; Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Fusarium proliferatum</i>	Tomate, concombre	Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pichia anomala</i>	Pomme	Jijakli et Lepoivre, 1998
	<i>Pichia guillemondii</i>	Fraisier	Guetsky <i>et al.</i> , 2002a ; b
	<i>Pichia membranifaciens</i>	Vigne	Masih et Paul, 2002
	<i>Pithomyces chartarum</i>	Vigne	Dodd et Stewart, 2003
	<i>Pythium citrinum</i>	Vigne	Paul, 2004
	<i>Pythium periplocum</i>	Vigne	Paul, 1999b
	<i>Pythium radiosum</i>	Vigne	Paul 1999a
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Tomate, pomme	Elad <i>et al.</i> , 1994b ; Sansone <i>et al.</i> , 2005
	<i>Trichoderma hamatum</i>	Tomate, concombre	Dik <i>et al.</i> , 1999
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Haricot, tomate, concombre, vigne	Zimand <i>et al.</i> , 1996 ; Elad, 2000 ; Rey <i>et al.</i> , 2001
<i>Trichoderma virens</i>	Tomate, concombre	Dik <i>et al.</i> , 1999	
<i>Ulocladium atrum</i>	Tomate, concombre, fraisier, cyclamen	Dik <i>et al.</i> , 1999 ; Berto <i>et al.</i> , 2001 ; Kessel <i>et al.</i> , 2002	

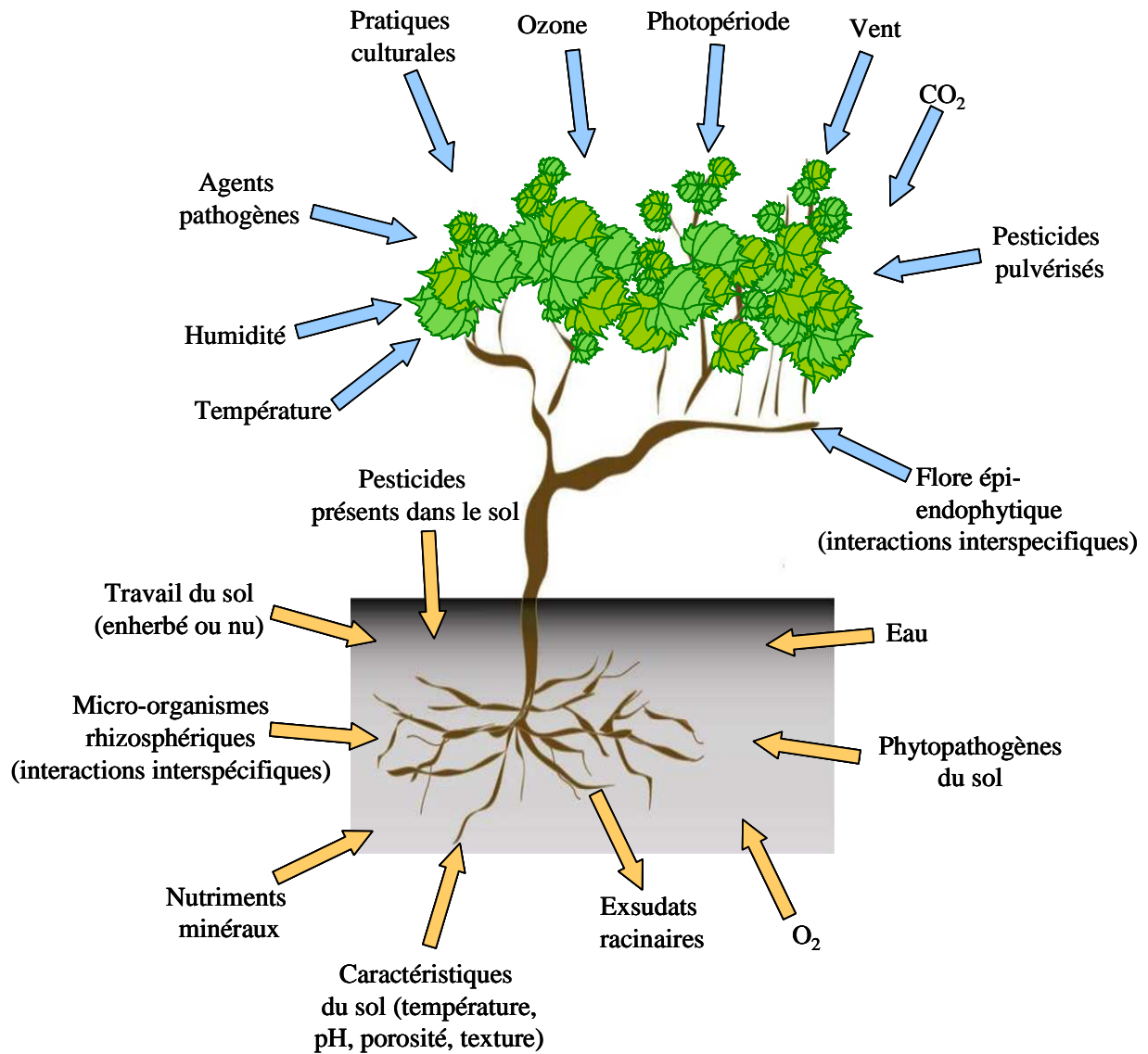


Figure 4 : Exemples de signaux environnementaux de nature physique, chimique ou biologique, pouvant affecter les associations plantes hôtes / bactéries endo- ou épiphytes, agents de lutte biologique (Davet, 1996 ; Strigul et Kravchenko, 2006).

dans différents processus associés à la croissance et au développement de la plante (accélération de la germination des semences, nodulation chez les légumineuses) (Bai *et al.*, 2002). Ces bactéries sont également capables de protéger les plantes contre différents agents pathogènes.

Parmi les quelques produits commerciaux homologués beaucoup ont été développés initialement pour la protection contre les maladies telluriques et ont une application secondaire sous serre. C'est le cas notamment de produits à base de *Streptomyces* sp., de *Trichoderma* sp., de *Gliocladium catenulatum* et de *Pythium oligandrum* (Whipps, 2001 ; Nicot, 2002 ; Ravensberg et Elad, 2002). En Europe, une seule souche de microorganismes est inscrite à l'annexe 1 de la directive 91/414/CE, il s'agit de *Coniothyrium minitans* commercialisée sous le nom de Contans® pour lutter contre les maladies induites par les champignons à sclérotés. Une souche bactérienne du genre *Bacillus subtilis* (Serenade®) vient d'être homologuée provisoirement en France contre *B. cinerea* chez la vigne (<http://www.agraquest>). D'autres microorganismes bactériens et fongiques sont sur le point de recevoir une autorisation de mise sur le marché, telle que *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma harzianum* et *Pseudomonas chlororaphis*.

3.5.2 Mécanismes d'actions des bactéries impliqués dans la lutte biologique

La lutte biologique au moyen de bactéries non pathogènes s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'actions. Ces bactéries peuvent agir directement sur l'agent pathogène, par antibiose, compétition ou parasitisme, ou bien indirectement par stimulation des réactions de défense de la plante conduisant à leur tour à la mise en place d'une résistance systémique vis-à-vis de l'agent pathogène.

a. Action directe sur les agents pathogènes

Antibiose

La production de substances antibiotiques par les microorganismes est un phénomène fréquent. Plusieurs antibiotiques ont été identifiés chez le genre *Pseudomonas*, tels que le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), le cyanure d'hydrogène, l'oomycine A, la phénazine, la pyolutéorine, la pyocyanine, la pyrrolnitrine, la tropolone ou encore des lipopeptides cycliques (viscosinamide, tensine, amphisine...) (Keel *et al.*, 1992 ; Mazzola *et al.*, 1992 ; Thrane *et al.*, 2000 ; Nielsen *et al.*, 2002 ; Raaijmakers *et al.*, 2002 ; De Souza *et al.*, 2003 ; Nielsen et Sorensen, 2003). Les genres *Bacillus*, *Streptomyces* ou des *Stenotrophomonas* sont aussi capables de produire l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicin A ou la

xanthobacine (Milner *et al.*, 1995; 1996 ; Hashidoko *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 1999 ; Nakayama *et al.*, 1999) (Figure 5). Ces composés, de haut poids moléculaire, sont capables à faible dose d'interférer avec la sporulation et la croissance mycélienne d'un large spectre de champignons (Ligon *et al.*, 2000 ; Raaijmakers *et al.*, 2002). L'antibiotique phenazine-1-carboxamide produit par *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 inhibe la croissance de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis*, ce qui limite la colonisation des racines de tomates par le champignon et diminue son pouvoir infectant (Bolwerk *et al.*, 2003). Ce mode d'action est le plus étudié chez les agents de lutte biologique, du fait de la simplicité des expérimentations conduisant à la sélection des souches productrices d'antibiotiques et à l'observation *in vitro* de leurs effets sur les organismes. Le rôle suppressif de ces composés a été évalué en utilisant des bactéries mutantes dont les gènes responsables de la production d'antibiotiques sont surexprimés ou réprimés (Raaijmakers *et al.*, 2002). Fenton *et al.* (1992) ont introduit un gène fonctionnel de la synthèse du DAPG issu de la souche de *Pseudomonas fluorescens* F113 chez une *P. fluorescens* F113G22 initialement déficiente. La souche transformée synthétise du DAPG et acquiert la capacité de protéger efficacement la betterave sucrière contre *Pythium ultimum*. L'efficacité des antibiotiques contre un pathogène est dépendante de la plante hôte. Ainsi, *P. fluorescens*, capable de synthétiser le DAPG, la pyolutéorine et le cyanure d'hydrogène, protège efficacement le concombre mais partiellement le maïs contre un pathogène commun : *P. ultimum* (Notz *et al.*, 2001)

Compétition

La compétition pour les éléments nutritifs (sucre, éléments minéraux...) est un mécanisme fortement impliqué dans la suppression de nombreux pathogènes. La compétition pour le fer par certaines souches de *P. fluorescens* est la plus documentée. Elle implique la production de différents sidérophores, molécules chélatrices du fer et servant de transporteur de l'ion ferrique à l'intérieur de la cellule bactérienne (Neilands, 1981 ; Duijff *et al.*, 1993 ; Buysens *et al.*, 1996 ; Whipps, 2001) (Figure 6). Les souches bactériennes les plus compétitives sont connues par leur capacité à produire des sidérophores ayant une très grande affinité pour le fer, telle que la pyoverdine (sidérophore fluorescent). Il existe aussi d'autres sidérophores non-fluorescents comme la pyochéline et la pseudomonine possédant une plus faible affinité pour le fer par rapport à la pyoverdine. La compétition pour le fer est démontrée par délétion de gènes spécifiques : l'activité protectrice contre *B. cinerea* d'une souche mutante de

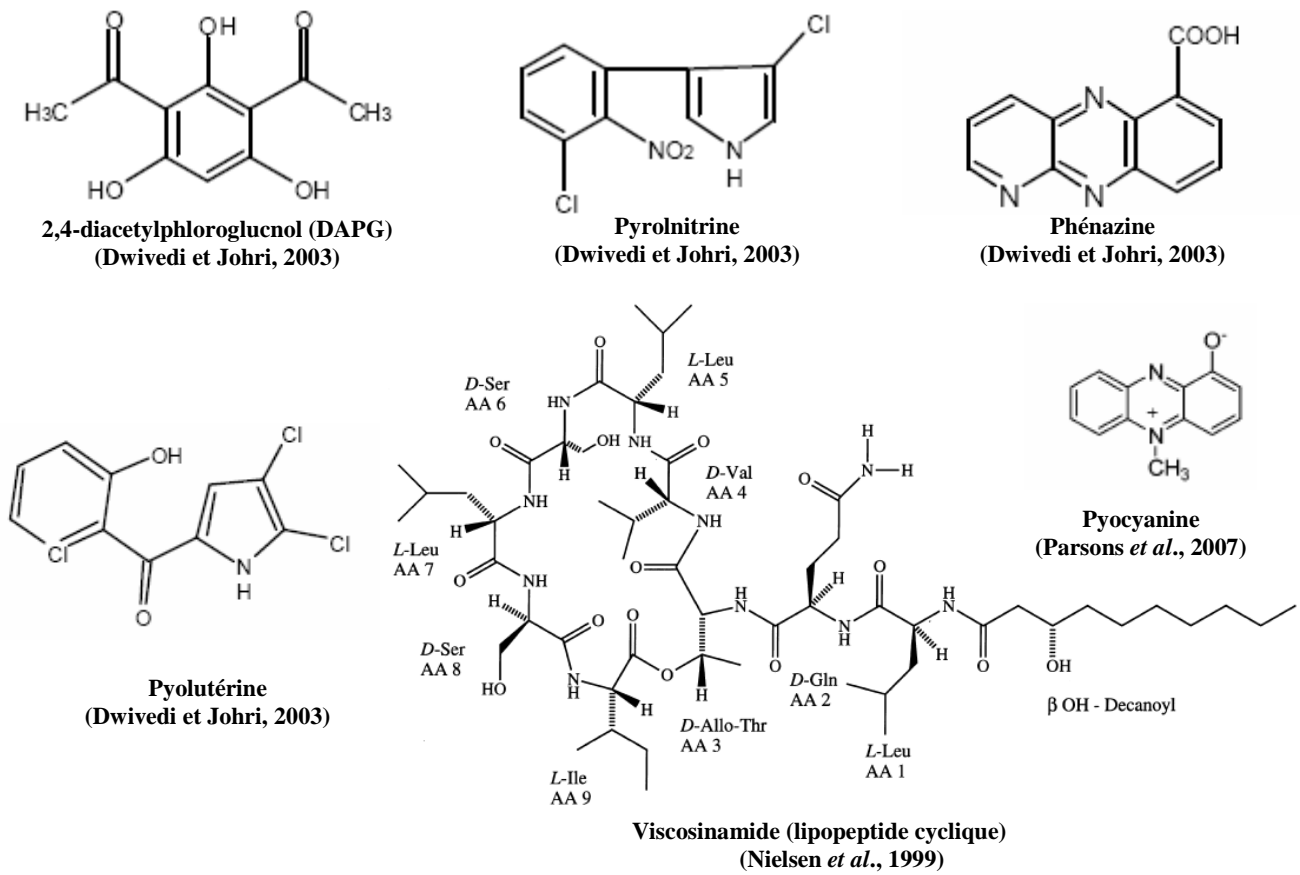


Figure 5 : Composés antibiotiques produits par *Pseudomonas sp.*

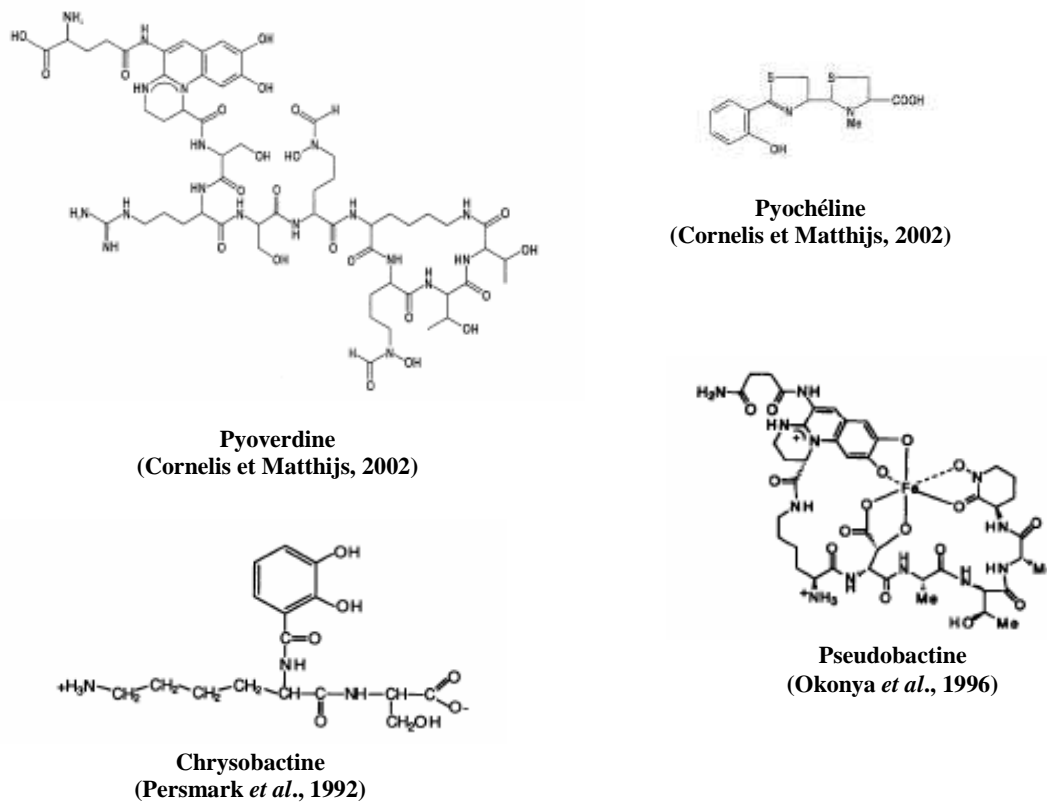


Figure 6 : Quelques exemples de sidérophores bactériens

P. putida (WCS358), incapable de produire des sidérophores, est fortement diminuée chez la tomate (Meziane *et al.*, 2005). L'efficacité d'une lutte biologique via le phénomène de compétition pour le fer semble être surtout importante dans des conditions limitantes en fer.

Parasitisme

Certains microorganismes, agents de la lutte biologique, sont capables de produire des enzymes hydrolytiques (chitinases, β -1,3-glucanases ou cellulases) pouvant dégrader les constituants pariétaux des cellules fongiques. L'altération de ces parois conduit à la lyse des cellules et inhibe ainsi le développement du champignon (Davet., 1996 ; Whipps, 2001). Ce mécanisme est fréquemment rencontré chez les champignons, tels que *Gliocladium* sp. et *Trichoderma* sp. (Carsolio *et al.*, 1999 ; Georgakopoulos *et al.*, 2002 ; Punja et Utkhede, 2003). Certaines études ont montré une corrélation entre la production d'enzymes chitinolytiques par des bactéries du genre *Bacillus* sp., *Lysobacter* sp., *Paenobacillus* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. et la capacité de ces souches à inhiber la croissance de champignons de sol, tels que *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* et *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* et *Bipolaris sorokiniana* (Lim *et al.*, 1991 ; Chernin *et al.*, 1995 ; Pleban *et al.*, 1997 ; Singh *et al.*, 1999 ; Palumbo *et al.*, 2005).

Atténuation de la virulence des pathogènes

Ce mécanisme correspond à une détoxification et/ou une inhibition de la synthèse des facteurs de virulence des pathogènes. Certaines bactéries, appartenant aux genres *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp. ou *Ralstonia* sp., sont capables de dégrader diverses toxines fongiques (acide fusarique, anthroquinone, thaxtomine A), qui sont d'importants déterminants de la pathogénicité des champignons (Doubou *et al.*, 1998 ; Thangavelu *et al.*, 2001 ; Malathi *et al.*, 2002). D'autres bactéries altèrent le métabolisme du pathogène via une dégradation des facteurs de régulation impliqués dans le quorum-sensing du pathogène et qui sont reconnus pour activer les facteurs de virulence (Dong *et al.*, 2000 ; Molina *et al.*, 2003 ; Morello *et al.*, 2004 ; Uroz *et al.*, 2003).

b. Induction de la résistance de la plante hôte

Diverses rhizobactéries, regroupées sous le terme de PGPR, ont une capacité à promouvoir la croissance de leur partenaire végétal par des effets sur la nutrition, l'architecture racinaire ou la santé de la plante (Schippers *et al.*, 1987 ; Glick, 1995). L'un des

effets remarquables de la colonisation de la rhizosphère par les PGPR est l'induction des mécanismes de la résistance que l'on nomme ISR (Induced Systemic Resistance) (Hammerschmidt *et al.*, 2001), par opposition à la SAR (Systemic Acquired Resistance) induite par les pathogènes (Ryals *et al.*, 1996). Plusieurs rhizobactéries du genre *Pseudomonas* ont la capacité d'induire une résistance systémique chez la plante, ce qui engendre une protection contre un grand nombre d'agents pathogènes fongiques et bactériens (Van Loon *et al.*, 1998 ; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Cette ISR a été démontrée chez de nombreuses plantes en séparant sur le plan spatial l'agent de la lutte biologique par rapport au site d'infection du pathogène (Hoffland *et al.*, 1995). Cette résistance s'avère dépendante du génotype végétal, de l'agent pathogène, mais aussi de la rhizobactérie. Ainsi la souche *P. fluorescens* WCS374r induit une ISR chez le radis mais pas chez *Arabidopsis* contre *Fusarium oxysporum*. A l'inverse, *P. putida* WCS358r induit une ISR chez *Arabidopsis* contre le même champignon mais pas chez le radis (Leeman *et al.*, 1995 ; Van Wees *et al.*, 1997). Quant à *P. fluorescens* WCS417r, elle induit une ISR chez les deux espèces végétales contre *Fusarium oxysporum* (Van Wees *et al.*, 1997). D'autres souches de type *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Bacillus pumilus* ont montré une capacité à induire une ISR chez de nombreuses plantes (cane à sucre, chêne, coton, pois, riz, tomate...) contre divers pathogènes, tels que *Colletotrichum falcatum*, *Ceratocystis fagacearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani* (Brooks *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1995 ; Benhamou *et al.*, 1996a ; Benhamou *et al.*, 1996b ; M'Piga *et al.*, 1997 ; Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Il est bien établi que l'ISR fait appel à l'expression des mécanismes de défense des plantes. Ces mécanismes seraient induits par les rhizobactéries elles-mêmes ou par des molécules dérivées de ces bactéries. L'utilisation de divers mutants d'*Arabidopsis*, a permis de montrer que certaines bactéries du genre *P. fluorescens*, sont capables de réduire les symptômes des maladies, via des mécanismes dépendant à la fois des voies du JA et de l'éthylène, mais indépendant de la voie de SA et de l'expression des protéines PR (Van Loon *et al.*, 1998 ; Knoester *et al.*, 1999 ; Pieterse *et al.*, 2002) (Figure 7). Des résultats similaires ont également été obtenus avec d'autres bactéries du genre *Bacillus* chez la tomate (Yan *et al.*, 2002). Néanmoins, d'autres travaux montrent que l'ISR pourrait être parfois dépendante de la voie de SA (De Meyer et Höfte, 1997 ; De Meyer *et al.*, 1999), indépendante des trois molécules signales (Ryu *et al.*, 2003) ou encore indépendante des voies du SA, du JA, du gène *NPRI* (Non-expresser of PR genes) tout en restant dépendante de l'éthylène (Ryu *et al.*

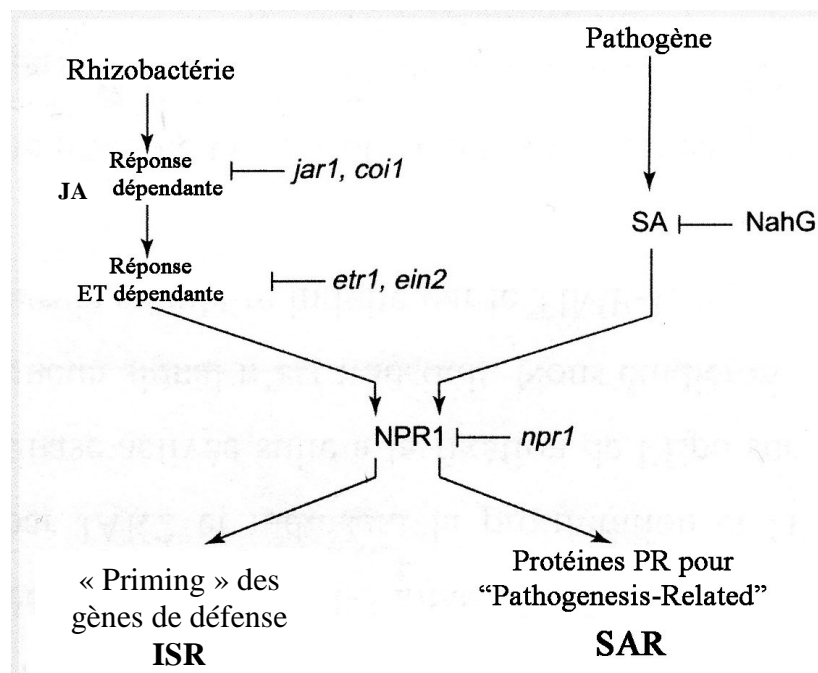


Figure 7. : Voies de transduction des signaux intervenant dans les phénomènes d'ISR et de la SAR chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Van Loon *et al.*, 2006). *npr1* : « Non-expresser of PR-1 gene », *NahG* : « Naphthalene Hydroxylase G » (gène bactérien codant pour une salicylate hydroxylase), *jar1* : « JAsmonate Response 1 », *coi1* : « COronative-Insensitive 1 », *etr1* : « EThylene Receptor 1 », *ein2* : « Ethylene INsensitive 2 ».

2004). Dans les situations où les plantes ne sont pas en état d'« ISR » ou de « SAR », leur état de résistance basale contre des pathogènes spécifiques serait régulée par l'action concertée des trois molécules signales (Pieterse *et al.*, 2002). De plus, la protéine NPR1 régule les réponses de défense par des voies de signalisation différentes.

La question du coût physiologique pour la plante à mobiliser une partie de son métabolisme nécessaire à l'induction des réactions de défense a également été soulevée (Heil, 2002). Le phénomène de potentialisation permet, en l'absence d'une stimulation des défenses de la plante, de la sensibiliser à déclencher plus rapidement ses réactions de défense suite à l'attaque par un pathogène. Ainsi, les coûts énergétiques du mécanisme de potentialisation seraient très faibles par rapport à ceux nécessaires à l'induction directe des réactions de défense (Van Hulten *et al.*, 2006). Le mécanisme de potentialisation permettant d'amplifier les réactions de défense suite à une infection secondaire serait donc d'un grand intérêt pour réduire les dépenses énergétiques de la plante (Pieterse *et al.*, 2002 ; Conrath *et al.*, 2006). Ce processus relèverait de l'implication de JA et de l'éthylène dans la sensibilisation et l'amplification de certaines réactions typiques de défense et donc de la mise en place de l'ISR (Knoester *et al.*, 1999 ; Ton *et al.*, 2001 ; Pieterse *et al.*, 2001). Parmi ces réactions, on note l'accumulation de composés phénoliques (Van Peer *et al.*, 1991 ; Benhamou *et al.*, 1996b ; Silva *et al.*, 2004) et l'activation de protéines PR (chitinase, β -1,3-glucanase et peroxydase) (Maurhöfer *et al.*, 1994 ; Nandakumar *et al.*, 2001 ; Silva *et al.*, 2004) ainsi que l'activation de la voie des octadécanoïdes (Silva *et al.*, 2004 ; Shores *et al.*, 2005) chez différentes plantes.

De plus, des rhizobactéries seules sont capables d'induire directement différentes réactions de défense, à savoir l'augmentation des niveaux de transcrits de certains gènes codant des protéines PR chez *A. thaliana* (Timmusk et Wagner, 1999 ; Cartieaux *et al.*, 2003) et l'accumulation de protéines PR (chitinase, β -1,3-glucanase, peroxydase) chez la betterave et le haricot (Zdor et Anderson, 1992 ; Bargabus *et al.*, 2002).

c. Déterminants potentiels de l'ISR déclenchée par les bactéries

Certaines rhizobactéries de la famille des pseudomonacées sont capables de synthétiser de nombreuses molécules de différentes natures impliquées dans l'induction ou la potentialisation des réactions de défense de la plante, conduisant à leur tour à la mise en place d'une ISR. L'utilisation de mutants bactériens déficients en différents composés a fait preuve de nombreuses démonstrations quant à la signification physiologique des constituants bactériens associées à l'ISR. Parmi les composés bactériens stimulateurs des réactions de

défense et / ou inducteurs de l'ISR, on note la production de sidérophores, d'antibiotiques, de lipopolysaccharides, d'EPS, de flagelline...

Sidérophores

L'induction de l'ISR est associée à la production de sidérophores et est dépendante du pathosystème (Duijff *et al.*, 1993 ; Leeman *et al.*, 1996 ; Bakker *et al.*, 2003). Les travaux réalisés par Höfte et ses collaborateurs sur *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 et ses mutants ont permis de mettre en évidence dans des conditions limitantes en fer, la production de trois sidérophores (la pyoverdine, la pyochéline et le SA), en relation avec l'induction de l'ISR chez le haricot et la tomate contre *B. cinerea* (De Meyer et Höfte, 1997 ; Audenaert *et al.*, 2002 ; Meziane *et al.*, 2005). L'utilisation de ces mutants montrent que le SA (en tant que précurseur de la biosynthèse de pyochéline chez les *Pseudomonas*) serait un déterminant important dans l'induction de l'ISR contre *B. cinerea*, puisque seuls les mutants incapables de synthétiser le SA ne protègent pas la plante contre le champignon (De Meyer et Höfte, 1997). Des études similaires ont été conduites chez d'autres plantes, telle qu'*A. thaliana* et ont permis de souligner l'importance des sidérophores dans la mise en place de l'ISR, soit par des approches de mutations, soit *via* des applications exogènes de sidérophores (Meziane *et al.*, 2005). Cette résistance sidérophore-induite est associée à l'expression de réactions typiques de défense, telles que l'induction de gènes de défense ou l'accumulation de protéines PR (Maurhöfer *et al.*, 1994 ; Dellagi *et al.*, 2005).

Antibiotiques

Une souche productrice d'antibiotiques, *P. fluorescens* CHA0 s'est avérée capable d'induire une résistance systémique envers *Peronospora parasitica* chez *A. thaliana* (Iavicoli *et al.*, 2003). La production du DAPG par *P. fluorescens* CHA0 semble être impliquée dans l'induction de cette résistance systémique. En effet, lors de la confrontation entre *P. parasitica* et *A. thaliana* colonisé par différents mutants de CHA0 (déficient en HCN, DAPG, pyolutéorine, exoprotéase de sidérophores), seules les mutants déficients en DAPG menaient à une baisse significative de l'ISR. Ces résultats ont été confirmés par des approches de complémentation chez les mutants déficients en DAPG. Ces travaux ont également montré que l'application de DAPG (10 à 100 μmol) au niveau des racines d'*Arabidopsis* mime l'effet de l'ISR (Iavicoli *et al.*, 2003). Récemment, l'application de souches de *B. subtilis* mutantes surexprimant un ou deux antibiotiques, la fengycine et la surfactine, conduit à l'expression d'une ISR chez la tomate et le haricot contre *B. cinerea* (Ongena *et al.*, 2007). L'action

concertée d'antibiotique et de sidérophore dans l'induction de l'ISR a également été rapportée chez la tomate à l'égard de *B. cinerea* (Audenaert *et al.*, 2002).

Lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont des composants majeurs de la paroi cellulaire (1×10^5 molécules de LPS par μm^2) des bactéries gram négatives (Dow *et al.*, 2000). L'implication de la fraction saccharidique et ou lipidique a fait preuve de nombreuses investigations (Graham *et al.*, 1977 ; Braun *et al.*, 2005). En effet, des souches de *P. fluorescens* mutantes incapables de synthétiser la fraction saccharidique du LPS, conduisent à une ISR chez *Arabidopsis* (Leeman *et al.*, 1995). Cette résistance ne s'exprime cependant pas chez le raifort (Leeman, *et al.*, 1995) probablement due à l'incapacité des populations mutantes à coloniser les tissus racinaires de la plante, comme il a été démontré chez la tomate (Duijff *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'intégrité de la structure amphiphile du LPS serait nécessaire à l'induction de réponses de défense. Des travaux antérieurs (Graham *et al.*, 1977) avaient postulé l'implication du complexe core-lipide A dans l'activité élicitrice du LPS. Les LPS induisent l'activation d'évènements précoces, l'accumulation de protéines PR et le dépôt de callose (Dow *et al.*, 2000 ; Coventry et Dubery, 2001 ; Meyer *et al.*, 2001 ; Gerber *et al.*, 2004a ; Gerber et Dubery, 2004b). D'autres travaux ont aussi montré que les LPS seraient impliqués dans la potentialisation de différentes réactions de défense conduisant à l'expression de l'ISR chez de nombreuses plantes (Newman *et al.*, 2002). Les LPS issus de bactéries non phytopathogènes (*Pseudomonas putida*, *Rhizobium etli*) sont capables d'induire une résistance des feuilles de tomate et de haricot à *B. cinerea*, des feuilles d'*A. thaliana* à la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Meziane *et al.*, 2005) et de la pomme de terre au nématode *Globodera pallida* (Reitz *et al.*, 2000).

Flagelline

La flagelline est l'un des constituants du flagelle qui assure la mobilité des bactéries, le plus souvent étudié chez les bactéries phytopathogènes (Preston, 2004). Néanmoins certains auteurs ont mis en évidence l'implication de flagelline de bactéries non-pathogènes dans l'induction de l'ISR (Meziane *et al.*, 2005). Cette flagelline est reconnue par *Arabidopsis* via son motif peptidique contenant 11 à 15 acides aminés retrouvés sur la partie N-Terminal (Taguchi *et al.*, 2003), conduisant à l'expression de différentes réactions de défense (Felix *et al.* 1999 ; Gómez-Gómez *et al.*, 1999 ; Blume *et al.*, 2000 ; Nühse *et al.*, 2000 ; Tanaka *et al.* 2003 ; Kunze *et al.*, 2004). Chez *A. thaliana*, l'application de flagelline issue de *Pseudomonas*

putida réduirait le développement de *P. syringae* pv. *tomato*, alors que chez la tomate ou le concombre, cette molécule n'affecte pas la croissance de *B. cinerea* (Meziane *et al.*, 2005).

Exopolysaccharides (EPS)

Les EPS font partie des constituants des parois bactériennes, composés de diverses unités saccharidiques (glucose ou fructose), de pyruvate et de succinate (Amellal *et al.*, 1998). Des études récentes ont attribué aux exopolysaccharides issus de *Pantoea agglomerans* une principale fonction dans la potentialisation de réactions de défense (en particulier du burst oxydatif) chez le blé et chez le riz (Ortmann *et al.*, 2006). En outre, les EPS de *P. agglomerans* sont aussi capables de stimuler directement ce type de réaction chez les cellules de tabac et du persil (Ortmann *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent l'existence de différents modes de reconnaissance ou d'action des EPS chez les monocotylédones ou chez les dicotylédones (Ortmann *et al.*, 2006).

Composés organiques volatiles

De nombreux composés volatiles, synthétisés par des bactéries non pathogènes, seraient aussi impliqués dans l'induction de l'ISR chez différentes plantes (Ping et Boland, 2004). L'importance de l'ISR serait liée à la nature de ces composés. Certains composés volatiles (le butane-2,3-diol et l'acétoïne) produits par *Bacillus subtilis* GB03 et par *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a sont capables d'induire un état d'ISR chez *A. thaliana* contre *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ryu *et al.*, 2004).

4 Lutte biologique chez la vigne

La majorité des travaux sur la lutte biologique chez la vigne font références le plus souvent à l'utilisation de champignons du genre *Candida*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Ulocladium* contre les maladies cryptogamiques (Munkvold et Marois, 1993 ; Zahavi *et al.*, 2000 ; Rey *et al.*, 2001 ; Elmer et Reglinski, 2006).

L'utilisation des bactéries reste limitée à quelques exemples d'études dans des conditions de laboratoire. Il a été rapporté que l'application d'une souche *Serratia liquefaciens* sur des disques foliaires de vigne réduirait fortement la sporulation de *B. cinerea* au travers de la synthèse de composés à activité antifongique (Whiteman et Stewart, 1998). Les travaux réalisés sur une bactérie du genre *Burkholderia phytofirmans* PsJN, isolée des racines d'oignon ont montré que la bactérie induit une croissance du vitroplant de vigne accompagnée d'une résistance contre *B. cinerea* (Ait Barka *et al.*, 2002). Cette souche est capable d'entrer à

l'intérieur des racines de la vigne et de se propager de façon systémique tout en induisant certains mécanismes de défense de la plante (Compant *et al.*, 2005). Une autre souche, du genre *Bacillus* a montré une certaine efficacité de lutte contre *B. cinerea* chez des vitroplants de vigne, en provoquant l'accumulation de resvératrol dans les feuilles (Paul *et al.*, 1998). Certains de ces effets ont été assimilés à la production d'antibiotiques par cette bactérie (Rabosto *et al.*, 2006), ce qui a permis de protéger les grappes de vigne contre les attaques de *B. cinerea*. Il a été également rapporté que l'application de *Bacillus subtilis* sur des plaies de tailles de vigne s'est montrée efficace pour contrôler le développement d'*Eutypa lata* (Ferreira 1990).

Il n'existe que peu d'applications actuelles de la lutte biologique sur vigne en France, puisque la première homologation (provisoire et sous réserve de compléments de résultats d'efficacité) a récemment été accordée à une bactérie antagoniste, *B. subtilis* souche QST713, sous le nom de Serenade® pour la protection des grappes contre la pourriture grise (<http://www.agra-quest.com>)

Des travaux récents ont permis d'isoler différentes souches de bactéries appartenant principalement à quatre genres (*Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* et *Pseudomonas*) à partir de la rhizosphère et des tissus sains de la vigne (Trotel-Aziz *et al.*, 2007). Ces souches sont capables de protéger les feuilles de vitroplants de vigne contre *B. cinerea* en induisant diverses réactions de défense (Trotel-Aziz *et al.*, 2007). Certaines de ces souches exercent aussi un effet direct sur le développement du pathogène. L'utilisation de bactéries locales en lutte biologique serait au moins un complément très prometteur pour consolider l'essor de la lutte intégrée au vignoble.

MA TERIEL

ET

METHODES

MATERIEL ET METHODES

1 Matériel biologique

1.1 Bactéries

Des travaux antérieurs ont permis de caractériser 7 souches bactériennes issues du vignoble champenois comme agents de lutte biologique potentiel contre *B. cinerea* (Trotel-Aziz *et al.*, 2007). Ces souches sont isolées du sol et des différentes parties de la vigne et sont identifiées comme *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et PTA-152 (issues des racines), *Bacillus subtilis* PTA-271 (issue du sol rhizosphérique), *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 (issues des feuilles), *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 (issue du sol rhizosphérique) et PTA-CT2 (issue des sarments).

1.1.1 Description des bactéries sélectionnées

a. *Acinetobacter lwoffii*

Les *Acinetobacter* sont actuellement inclus dans la famille des Moraxellaceae. Ce sont des bactéries ubiquistes qui ont pour principal habitat le sol, les eaux et les végétaux. Elles sont immobiles, non-sporulées, Gram négative, oxydase négative, catalase positive, aérobies strictes et sont capables d'utiliser un grand nombre de sources carbonées et notamment le lactate, l'acétate ou le pyruvate. Jusqu'à présent ce genre bactérien à rarement été utilisé en lutte biologique (Roberts *et al.*, 2005).

b. *Bacillus subtilis*

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont ubiquistes de l'environnement et particulièrement du sol où elles seraient impliquées dans les cycles biochimiques du carbone et de l'azote. Ce sont de bons candidats pour la lutte biologique, car elles produisent des endospores tolérantes à un grand nombre de contraintes extérieures (chaleur, dessiccation). Les *Bacillus* sont également connues comme des bactéries produisant un large spectre de molécules antibiotiques (fongistatine, fongocine, bacilline...), impliquées dans le contrôle de maladies fongiques (Pleban *et al.*, 1995 ; Nair *et al.*, 2002 ; Touré *et al.*, 2004). Ces souches

bactériennes sont plutôt mobiles, généralement Gram positive (en culture jeune), catalase positive, aérobies strictes ou anaérobies facultatives.

c. *Pantoea agglomerans*

Le genre *Pantoea*, découvert par Gavini *et al.* (1989) et anciennement appelé *Erwinia herbicola*, correspond au quatrième cluster résultant de la division des Entérobactéries en 1998. Ce sont des bactéries ubiquistes retrouvées à la surface des plantes, au sein des semences, dans les sols, dans l'eau ou dans l'urine et le sang des mammifères. Les souches bactériennes sont mobiles, Gram négative, catalase positive, oxydase négative, anaérobies facultatives et sont capables d'utiliser un grand nombre de sources carbonées. Ces bactéries représentent une part importante des souches qui composent la microflore de la rhizosphère du blé (Kleeberger *et al.* 1983), de plus elles sont fréquemment retrouvées sur les lésions des tissus foliaires mais rarement considérées comme pathogènes. Certaines de ces souches seraient également impliquées dans la lutte contre des champignons pathogènes (Bryk *et al.*, 1998 ; Nunes *et al.*, 2001).

d. *Pseudomonas fluorescens*

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula et appartient à la famille des Pseudomonaceae. Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux, et souvent pathogènes des animaux et des végétaux. Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne, elles sont retrouvées sous tous les horizons, particulièrement les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (Haas et Keel, 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000). De plus, ces bactéries produisent de nombreux métabolites ayant une action antibiotique en particulier vis-à-vis des champignons. Les *Pseudomonas* sont également compatibles avec un grand nombre de pesticides (Zablotowicz *et al.*, 1992) et d'agents de lutte biologique (Lemanceau et Alabouvette, 1991 ; Ji *et al.*, 2006). Enfin, elles peuvent facilement être manipulées

génétiquement. Ces souches sont généralement mobiles, Gram négative, catalase positive, aérobies strictes.

1.1.2 Culture et utilisation des bactéries

Les bactéries sélectionnées sont mises en culture sur milieu liquide non sélectif de Luria-Bertani contenant du tryptone 1% (p/v), de l'extrait de levure 1% (p/v) et du NaCl 0,5% (p/v). Les cultures sont mises en agitation continue (110 rpm), à 25°C pendant 24 heures. Leur concentration est évaluée au spectrophotomètre à 450 nm et à 650 nm. Pour chaque bactérie, la concentration correspondant à 1 unité d'absorbance est déterminée à 450 et 650 nm (Tableau I). Les solutions bactériennes sont ensuite diluées pour obtenir les concentrations désirées pour les expérimentations au laboratoire et au terrain (1×10^4 à 1×10^8 UFC ml⁻¹). Les mélanges bactériens sont réalisés extemporanément à leur utilisation au vignoble.

1.2 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est une forme imparfaite de l'agent responsable de la pourriture grise (forme parfaite : *Botryotinia fuckeliana* de Bary Wetzhel). Il appartient au phylum des Ascomycètes, à la sous-classe des Discomycètes inoperculés, à l'ordre des Léotiales et à la famille des Sclerotiniacées. Nécrotrophe, ce champignon peut survivre sous forme saprophytique sur toutes sortes de débris organiques (anfractuosités de l'écorce, plantes herbacées, débris de tailles...). Une seconde forme de conservation hivernale peut être observée. Il s'agit des sclérotés, qui sont des amas de mycélium mélanisé.

Les contaminations des tissus végétaux par *B. cinerea* observées au vignoble sont causées principalement par les spores asexués (conidies), c'est donc cette forme d'inoculum qui a été choisie pour réaliser les études menées en conditions contrôlées impliquant une inoculation du champignon.

La souche de *B. cinerea* utilisée est l'isolat 630 et est maintenue en culture pure en erlenmeyer sur une gélose stérile tomate-agar (milieu V8) composée de jus de tomate commercial (250 ml l⁻¹) et d'agar (25 g l⁻¹). Pour obtenir une solution conidienne, les spores d'une culture de *B. cinerea* âgée d'environ 4-6 semaines ont été mises en suspension en présence d'eau déminéralisée stérile (10 ml). Un barreau magnétique stérile est déposé sur la gélose et mise en agitation pendant 5 minutes afin de détacher les spores asexuées des conidiophores. Puis l'eau enrichie en spores est reprise et les débris de mycélium sont

Tableau I : Equivalent concentration bactérienne par unité d'absorbance *
 UFC : Unité Formant Colonie

	Concentration bactérienne (UFC ml ⁻¹)	
	A450 = 1	A650 = 1
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	2,423. 10 ⁸	4,172.10 ⁸
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	5,022. 10 ⁸	8,688. 10 ⁸
<i>B. subtilis</i> PTA-271	1,890. 10 ⁹	2,915. 10 ⁹
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	1,930. 10 ¹⁰	3,087. 10 ¹⁰
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	2,650. 10 ¹⁰	4,766. 10 ¹⁰
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	2,055. 10 ¹⁰	3,470. 10 ¹⁰
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	5,960. 10 ⁷	1,021. 10 ⁸

éliminés par filtration de la suspension au travers d'un filtre de verre. Enfin la concentration conidienne est déterminée au moyen d'une cellule de Thoma, puis la suspension est ajustée à une concentration de 1×10^5 spores ml^{-1} .

1.3 Matériel végétal

La vigne est une plante ligneuse grimpante à souche pérenne, Angiosperme, dicotylédone qui appartient au phylum des Terebinthales-Rubiales, à l'ordre des Rhamnales, à la famille des Vitacées et au genre des *Vitis* (Tournefort, 1700). D'après Planchon, ce genre se divise en deux sections, les *Muscanidia* et les *Euvitis*, dénommées aujourd'hui les *Vitis*. Ces dernières se divisent en 108 espèces, dont 28 espèces fossiles, 20 espèces d'identification douteuse et 60 réparties en espèces dites américaines, asiatiques ou euro-asiatiques. Les vignes actuellement cultivées en France, d'espèces euro-asiatiques *Vitis vinifera* (Linné, 1753), se déclinent en de nombreuses variétés (cépages), approximativement 5000, dont il n'existe pas actuellement de clé de détermination universelle. Le vignoble de Champagne Ardenne couvre environ 30 000 hectares (source CIVC, site internet : [http : //www.champagne.fr](http://www.champagne.fr)) et est constitué majoritairement de trois cépages, deux cépages à raisins rouges, le Pinot Noir et le Pinot Meunier, et un cépage à raisins blancs, le Chardonnay. Ce dernier cépage, utilisé dans notre étude, est connu pour être moyennement sensible au mildiou (*P. viticola*), plus sensible à l'oïdium (*E. necator*) et très sensible à la pourriture grise (*B. cinerea*). L'ensemble des cépages se multiplient aisément par voie végétative : bouturage, marcottage ou greffage, ils ont également la capacité d'émettre facilement des racines et de supporter des doses élevées en calcaire dans les sols.

1.3.1 Conditions de culture et obtention de vitroplants

Les vitroplants sont multipliés par microbouturage sur un milieu gélosé de Martin Martin (Martin *et al.*, 1987) dépourvu d'hormones, dont la composition est présentée dans le tableau II. Les vitroplants sont maintenus en enceinte phytotronique dans des conditions contrôlées à 25°C, 80% d'humidité relative et une intensité lumineuse de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant 16 heures.

1.3.2 Dispositifs expérimentaux au vignoble

Les effets des bactéries sur *B. cinerea* ont été étudiés dans deux parcelles, une située à

Tableau II : Milieu de culture Martin Martin (MM) (Martin *et al.*, 1987)

Composés	Concentration
Macroéléments	100 ml l ⁻¹
Microéléments	1 ml l ⁻¹
Vitamines	1 ml l ⁻¹
Fe-EDTA	37,32 mg l ⁻¹
Glutamine	200 mg l ⁻¹
Glycine	100 mg l ⁻¹
Myo-Inositol	100 mg l ⁻¹
Saccharose	30 g l ⁻¹
Agar	7 g l ⁻¹

Macroéléments	
NH ₄ NO ₃	4 g l ⁻¹
KNO ₃	10 g l ⁻¹
CaCl ₂ , 2H ₂ O	4,4 g l ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2 g l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,7 g l ⁻¹

Microéléments	
KI	0,83 g l ⁻¹
H ₃ BO ₃	6,2 g l ⁻¹
MnSO ₄ , H ₂ O	22,3 g l ⁻¹
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6 g l ⁻¹
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025 g l ⁻¹
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025 g l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25 g l ⁻¹

Vitamines	
Acide nicotinique	0,5 g l ⁻¹
Pyridoxine, HCl	0,5 g l ⁻¹
Thiamine, HCl	0,1 g l ⁻¹

Cernay-les-Reims (CR) sur le lieu dit de « Noues Crats » et l'autre à Nogent l'Abbesse (NL) sur le lieu dit « Les Rouas ». Toutes les deux sont constituées du cépage Chardonnay (clone 78) avec un porte greffe 41B. Les vignes sont âgées de 10 ans (en 2003) et sont conduites en mode « chablis » avec une densité de 1,05 x 1,20 souches ha⁻¹.

Le tableau III présente les caractéristiques des sols des deux parcelles expérimentales. Cette description se focalise essentiellement sur les fractions texturales de la partie minérale des sols déterminées par l'analyse granulométrique, le pourcentage de matière organique, la présence des carbonates, le pH des sols...

Tableau III : Description des caractéristiques des sols viticoles de Cernay-les-Reims et de Nogent l'Abbesse.

Couverture du sol	Cernay-les-Reims	Nogent l'Abbesse
	Nue	Enherbée
	Granulométrie (%)^o	
Argiles < 2 µm	32,0	28,9
Limons fins 2-63 µm	17,2	30,6
Limons grossier 63-212 µm	11,0	8,4
Sables fins 212-600 µm	18,8	11,1
Sables grossiers > 600 µm	21,0	21,0
Azote total (%)	0,12	0,19
Matière organique (%)	2,8	4,2
Calcaire total (%)	30,4	64,8
CEC (meq 100g ⁻¹)	14,1	10,3
K ₂ O (mg l ⁻¹)	287	342
Rapport C/N	13,2	12,9
Conductivité (mS cm ⁻¹) ^a	2,69	2,53
pH eau	8,35	8,26
pH CaCl ₂ ^a	7,85	8,05

CEC : Capacité d'Echange Cationique

^a Mesuré dans une solution de CaCl₂ à 0,01 M.

Les molécules phytosanitaires, originellement utilisées sur les parcelles expérimentales CR et NL pour lutter contre divers pathogènes ou adventices, ont été testées à différentes concentrations en présence des bactéries issues du vignoble Champenois. Ces tests visent à caractériser l'innocuité de ces produits de synthèse vis-à-vis des bactéries appliquées au vignoble. Les résultats ont montrés une innocuité d'un grand nombre des produits formulés sur les bactéries dans les gammes de concentrations appliquées sur les parcelles viticoles. Néanmoins, certains de ces produits s'avèrent bactéricides (tels que Valiant, Mikal et Amino)

et ont été retirés du programme de traitement phytosanitaire réalisé sur les deux parcelles dès la saison 2003. Durant les campagnes 2002 à 2005, différents produits chimiques ont été appliqués pour lutter contre l'oïdium et le mildiou (Annexe 1).

1.3.3 Traitements

a. Vitroplants de vigne

L'expérience consiste à exciser des feuilles de vitroplants d'environ 8 à 10 semaines et à les incuber dans un milieu tamponné (MES : 9,76 g l⁻¹ additionné de CaCl₂ : 73,5 mg l⁻¹ et de K₂SO₄ : 87,1 mg l⁻¹, pH 5,9) contenant les bactéries à différentes concentrations cellulaires (pétiole trempant dans le milieu d'incubation : Figure 1).



Figure 1 : Incubation des feuilles de vitroplants en présence des bactéries

b. Application des bactéries

Dans la parcelle CR, les bactéries ont été appliquées selon trois modalités : (i) par infiltration à l'aide d'une seringue au niveau des jeunes bourgeons à raison de 10 ml par cep de vigne, (ii) par pulvérisation sur le feuillage (face supérieure et inférieure des feuilles) à raison de 100 ml par cep et (iii) par dépôt au sol de chaque pied de vigne à raison de 200 ml par cep. Les bactéries ont été appliquées en 2002, en 2003 et en 2004. Les traitements à l'aide des bactéries n'ont pas été renouvelés en 2005.

7 souches bactériennes ont été appliquées en souches individuelles ou en mélanges (Tableau V), selon le schéma présenté en figure 2.

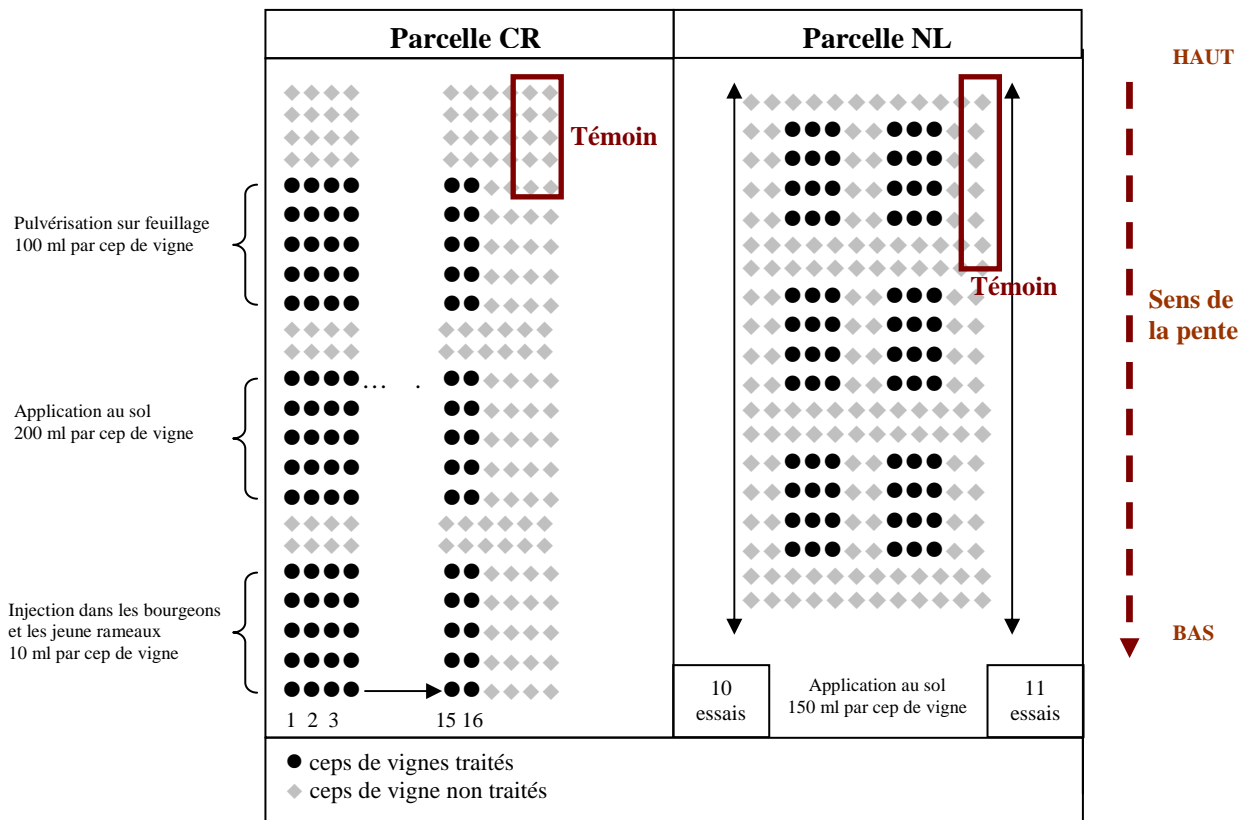


Figure 2 : Schéma du plan des traitements réalisés au vignoble dans les parcelles de Cernay-les-Reims (CR) et Nogent l'Abbesse (NL) en 2003 et en 2004.

Tableau V : Bactéries appliquées en culture pure ou en mélanges dans la parcelle CR suivant trois modalités différentes : infiltration dans les bourgeons, pulvérisation foliaire et au sol.

Bactéries individuelles	Mélanges
	PTA-113+PTA-152 = AL
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	PTA-152+PTA-AF1 (152+AF1)
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	PTA-268+PTA-CT2 = PF
<i>B. subtilis</i> PTA-271	PTA-152+PTA-AF1 = 152+AF1
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	PTA-152+PTA-CT2 = 152+CT2
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	PTA-AF1+PTA-CT2 = AF1+CT2
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	PTA-152+PTA-AF1+PTA-CT2 = 152+AF1+CT2
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	PTA-152+PTA-271+PTA-AF1+PTA-CT2 = 152+271+AF1+CT2
	MIX 7 = 271 + AL + PA + PF

Dans la parcelle NL, les bactéries individuelles ou en mélanges ont été appliquées par dépôt au sol de chaque pied de vigne à raison de 150 ml par cep (Figure 2) en 2002, en 2003 et en 2004 (Tableau VI). En 2005, les traitements n'ont pas été renouvelés avec les bactéries.

Tableau VI : Bactéries appliquées au sol en culture pure ou en mélanges dans la parcelle NL.

Cultures pures	Mélanges de souches		
	Binaires	3 ou 4 souches	5 ou 6 souches
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	AL (113+152)	AL + 271	AL + 271 + PA
<i>A. lwoffii</i> PTA-152		AL + PA	AL + 271 + PF
<i>B. subtilis</i> PTA-271	PA (AF1+AF2)	AL + PF	AL + PA + PF
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1		271 + PA	271 + PA + PF
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	PF (268+CT2)	271 + PF	L'ensemble des souches MIX 7 = AL+271+PA+PF
<i>P. fluorescens</i> PTA-268		PA + PF	
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2			

2 Méthodes d'analyse

2.1 Evaluation de l'effet des bactéries sur la protection de la vigne contre *B. cinerea*

2.1.1 Au laboratoire

Des feuilles de vitroplants de vigne, préalablement soumises à différents traitements bactériens, sont délicatement essuyées avec un mouchoir en coton et placées, face adaxiale au

dessus, dans une boîte de Pétri contenant du papier Whatman humidifié avec de l'eau déminéralisée.

Ces feuilles sont ensuite légèrement blessées à l'aide d'un cône de pipette et contaminées artificiellement par *B. cinerea* (suspension conidienne : 1×10^5 spores ml^{-1}). Les feuilles sont incubées à une température de 25°C sous lumière continue durant toute la durée de l'expérience. Les tests sont arrêtés 7 jours après l'inoculation du pathogène. L'étendue de la nécrose sur les feuilles, proportionnelle au pourcentage de protection induite par les bactéries, est calculé.

2.1.2 Au vignoble

De jeunes feuilles, indemnes de symptômes de maladie ou de blessures, sont détachées des ceps de vigne ayant été traités ou non avec les bactéries. Elles sont placées immédiatement face adaxiale au dessus, dans une boîte de Pétri contenant du papier Whatman humidifié avec de l'eau déminéralisée. Les feuilles ramenées au laboratoire sont légèrement blessées, infectées avec une suspension de conidies de *B. cinerea* (1×10^5 spores ml^{-1}) puis incubées à 25°C sous lumière continue. Les tests sont arrêtés 7 jours après l'inoculation du pathogène et la taille de la nécrose est déterminée.

2.1.3 Intensité de contamination des baies

L'intensité de contamination correspond au pourcentage de baies infectées par *B. cinerea* par rapport au nombre total de baies d'une grappe. L'estimation de l'intensité de contamination a été réalisée au vignoble avec l'aide du Groupement de Développement Viticole de la Marne (GDV) dans la parcelle NL, environ 20 jours après les vendanges en 2004 (28/10/2004) et deux jours avant les vendanges en 2005 (21/09/2005). L'intensité de contaminations a été déterminée sur un total de 100 grappes par traitement, à raison de 50 grappes orientées du côté Ouest et 50 grappes orientées du côté Est des rangs de vigne.

2.2 Estimation de la colonisation des tissus foliaires par les bactéries

Une première expérience est réalisée sur une seule souche bactérienne dans le but d'estimer l'influence des concentrations bactériennes du milieu d'incubation sur la concentration des populations colonisant les tissus foliaires sur un temps fixé. Les feuilles détachées de vitroplants sont incubées en présence de *P. agglomerans* PTA-AF2 à 1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 et 1×10^8 UFC ml^{-1} pendant 24 heures. Les feuilles sont reprises, lavées par agitation dans trois béciers contenant 200 ml de NaCl 0,85% stérile pendant 10 minutes

puis sont essuyées délicatement. Les tissus foliaires sont ensuite broyés au mortier-pilon en présence d'une solution stérile de NaCl 0,85% à raison d'1 ml pour 250 mg de feuilles. L'extrait obtenu est dilué d'un facteur de 100 et de 200, puis une aliquote de 100 µl de la suspension est étalée sur boîte de milieu LB gélosé. Après 24 et 48 heures d'incubation à 25°C, le nombre de bactéries est déterminé et rapporté au g de poids frais de feuilles.

Au cours d'une seconde expérience, les feuilles sont incubées en présence des bactéries à des concentrations de 10^6 UFC ml⁻¹ pendant 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36 et 48 heures. Les feuilles sont reprises, lavées par agitation dans trois béchers contenant 200 ml de NaCl 0,85% stérile pendant 10 minutes puis sont essuyées délicatement. Les feuilles sont ensuite lavées, essuyées et broyées dans du NaCl à 0,85%. Les extraits sont dilués puis 100 µl de la suspension sont étalés sur du milieu LB gélosé dans des boîtes de Petri. Après 24 et 48 heures d'incubation à 25°C, le nombre de bactéries est déterminé et rapporté au g de poids frais de feuilles.

Comme toute analyse microbiologique, ces manipulations sont conduites selon des conditions de stérilité parfaite, avec du matériel stérilisé par passage préalable à l'autoclave (20 min à 120°C).

2.3 Détermination des réactions de défense chez la vigne

2.3.1 *Activité lipoxygénase*

Les feuilles sont broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon conservés dans de la glace à 4°C en présence de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH = 6,5) contenant 1 mM de phénylméthylsulfonylfluoride (ou PMSF), 1% (p/p) de polyvinylpolypyrrolidone (ou PVPP) et de 0,25% (v/v) de triton X-100 à raison d'1 ml de tampon pour 250 mg de tissus foliaires. L'extrait est centrifugé 30 min à 4°C à 20 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait enzymatique.

Le dosage de l'activité LOX s'effectue par spectrophotométrie, selon la technique d'Axelrod *et al.* (1981), en mélangeant 875 µl de tampon de phosphate de sodium (50 mM, pH = 6), 100 µl d'acide linoléique (10 mM) et 25 µl d'extrait enzymatique. Le substrat est préparé en solubilisant de l'acide linoléique et du tween 20 (1/1 v/v) dans du tampon de dosage dégazé aux ultrasons. 10 à 20 µl de soude (1 M) sont ajoutées afin d'éliminer le trouble qui aurait pu se former dans le substrat. La réaction est suivie pendant différents temps d'incubation (30 sec, 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 et 20 minutes) afin de suivre l'augmentation

d'absorbance à 234 nm au cours du temps. L'activité est donc évaluée en déterminant la vitesse initiale de chaque cinétique enzymatique.

2.3.2 *Activité phénylalanine-ammonia-lyase (PAL)*

Les feuilles sont broyées à l'aide d'un mortier et d'un pilon conservés dans de la glace à 4°C, en présence d'un tampon phosphate potassique (100 mM, pH = 8) contenant 1,4 mM de β -mercaptoéthanol et de 1% (p/p) de PVPP à raison d'1 ml de tampon pour 250 mg de tissus foliaires. L'extrait est centrifugé 15 minutes à 4°C à 13 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait enzymatique.

L'activité PAL est mesurée par spectrophotométrie selon la méthode de Tanaka *et al.* (1974) en mélangeant 450 μ l de tampon Tris-HCl (100 mM, pH = 8,8), 200 μ l de L-phénylalanine (40 mM) et 150 μ l d'extrait enzymatique. Le substrat est préparé en solubilisant la L-phénylalanine dans un volume donné de tampon de dosage (tampon Tris-HCl). La réaction est suivie pendant 30 minutes à 37°C puis est stoppée par ajout d'acide trichloroacétique (TCA) à 25% (p/v). Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 4°C à 10 000 g et l'absorbance du surnageant est lue à 280 nm. L'activité est évaluée en déterminant la vitesse initiale de chaque cinétique enzymatique, l'augmentation de l'absorbance est due à la production de l'acide cinnamique consécutive à la dégradation de la L-phénylalanine par la PAL.

2.3.3 *Activités chitinase et β -1,3-glucanase*

Pour l'extraction des protéines de défense de la vigne (chitinases et β -1,3-glucanases), les feuilles sont broyées à l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Puis une seconde fois broyées dans un tampon d'extraction d'acétate de sodium (50 mM, pH = 5) contenant 1 mM de dithiothreitol (DTT) ; 0,2% (p/v) de PMSF et 1% (p/p) de PVPP à raison d'1 ml pour 250 mg de tissus à 4°C. Concernant les baies, elles sont tout d'abord épépinées puis broyées à l'ultra-turrax en présence du tampon d'extraction concentré 2 fois, à raison d'1 ml pour 500 mg de baies. Les extraits sont ensuite centrifugés 5 min à 4°C à 9 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires et le surnageant est récupéré et constitue l'extrait enzymatique.

a. Activité chitinase

Le dosage de l'activité chitinase s'effectue par spectrophotométrie selon la technique décrite par Derckel *et al.* (1996), en mélangeant 150 μ l d'eau, 100 μ l de tampon acétate de sodium (50 mM) et 100 μ l de substrat CM-chitin-RBV (LOEWE BIOCHEMICA) et 50 μ l

d'extrait enzymatique. La réaction se déroule à 37°C, pendant 0 ; 1 ; 2,5 ; 5 minutes. La réaction est stoppée par ajout de 400 µl d'HCl à 0,3 N froid. Les tubes sont ensuite transférés pendant au moins 10 minutes dans la glace et centrifugés (10 000 g x 5 min à 4°C) afin d'éliminer le substrat non-hydrolysé. L'absorbance du surnageant est lue à 550 nm et l'activité est évaluée en déterminant la vitesse initiale de chaque cinétique enzymatique. La gamme étalon est obtenue par dilution en série du substrat au 1/2, au 1/5, au 1/10 et au 1/20 puis mesure de l'absorbance à 550 nm.

b. Activité β -1,3-glucanase

La mesure de l'activité β -1,3-glucanase repose sur le même principe que le dosage de l'activité chitinase à la différence du substrat utilisé qui est ici le CM-curdlan-RBB (LOEWE BIOCHEMICA). La réaction enzymatique se déroule dans les conditions similaires au dosage des chitinases. De plus, l'activité β -1,3-glucanase des feuilles de vitroplants est estimée sur des temps de cinétique atteignant 30 minutes. Après l'étape de centrifugation, l'absorbance du surnageant est lue à 600 nm. La gamme étalon est obtenue par dilution en série du substrat au 1/2, au 1/5, au 1/10 et au 1/20 puis mesure de l'absorbance du colorant à 600 nm.

2.4 Analyse des acides gras totaux et libres

2.4.1 Extraction des acides gras

a. Acides gras totaux

Les acides gras sont extraits à partir de 500 mg des feuilles de vitroplants selon la technique de Bligh et Dyer (1959). Les tissus foliaires sont broyés dans du méthanol refroidi à -20°C en présence de Butyl Hydroxy Toluène (BHT) (0,02%). L'acide heptadécanoïque (C17:0) est utilisé comme standard interne. Les extraits sont homogénéisés dans un volume total de 10 ml de méthanol-chloroforme (2/3 v/v) pendant 30 min, puis centrifugés (1000 g x 5 min à 4°C). Le surnageant est récupéré et l'opération est répétée deux autres fois avec 5 ml de méthanol-chloroforme (2/3 v/v). Les surnageants sont réunis et 5 ml de NaCl (7,5% p/v) sont ajoutés. La phase chloroformique est ainsi récupérée puis évaporée sous flux continu d'azote. Le résidu est remis en suspension dans 1 ml de chloroforme. Les extraits sont alors conservés sous azote à -20°C jusqu'à leur analyse.

b. Acides gras libres

Les feuilles de vitoplants (250 mg) de vigne sont broyées à l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le broyat est extrait dans un mélange de méthanol et de chloroforme (1/1 v/v), refroidi à -20°C , en présence de BHT (0,02%). L'acide heptadécanoïque (C17:0) est utilisé comme standard interne. Les extraits sont agités pendant 30 minutes à température ambiante, puis centrifugés 15 minutes à 4°C à 3500 g afin d'éliminer les débris cellulaires. 1,5 ml du surnageant est récupéré et placé dans un flacon sombre, puis évaporé sous flux continu d'azote jusqu'à l'obtention d'un résidu sec.

2.4.2 Transestérification

a. Méthylation des acides gras totaux

L'extrait brut lipidique est méthylié suivant la méthode de Metcalf *et al.* (1966), par transestérification directe dans 500 μl d'une solution de trifluorure de bore (BF_3)-méthanol (14%). Après refroidissement, 3 ml d'eau distillée sont ajoutées, ainsi que 2 ml d'hexane qui permettront d'extraire les acides gras. L'extrait est alors évaporé sous flux d'azote et les résidus sont repris dans 750 ml d'hexane.

b. Méthylation des acides gras libres

L'extrait brut obtenu après extraction est méthylié par l'ajout 100 μl d'éther de diazométhane. Après deux minutes de méthylation à l'obscurité, 500 μl d'eau et 500 μl d'hexane sont ajoutés. Le surnageant, composé de la phase organique, est récupéré et évaporé sous flux continu d'azote. Les résidus sont repris dans 10 μl d'hexane.

2.4.3 Séparation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La séparation des méthyl-esters d'acides gras est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer P22, Courtaboeuf) sur une colonne capillaire (Supelcowax-10, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm d'épaisseur de film Supelco, Saint Quentin Fallavier). Les méthyl-esters d'acides gras séparés sont détectés par ionisation de flamme (FID). Une fraction de l'extrait lipidique brut (2 μl) est utilisée pour chaque chromatographie. La température du four est initialement de 190°C pendant 10 minutes, puis celle-ci s'élève de $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ jusqu'à atteindre une température finale de 230°C maintenue pendant 7 minutes. L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur.

2.4.4 Identification et quantification

L'identification et la détermination quantitative de chacun des esters méthyliques d'acide gras est obtenue sur la base de son temps de rétention et de la surface du pic concerné en référence aux acides gras standards (Oil reference standard AOCS N°6, Sigma et Menhaden Oil, PUFA No.3, Supelco) traités dans les mêmes conditions d'analyse chromatographique.

2.5 Analyses statistiques

Les expériences au laboratoire ont été réalisées en triplicata, à l'exception de celles correspondantes à la dynamique des populations colonisant les tissus foliaires qui sont réalisées en duplicata. En ce qui concerne les expériences au vignoble, les activités enzymatiques ont été déterminées à partir de triplicata pour chacun des traitements à raison de trois dosages d'activités par échantillon. Les tests de protection sur feuilles ont été effectués en 2004 et en 2005, à raison 20 à 30 feuilles par traitement. Enfin, l'intensité de la contamination des baies de *B. cinerea* a été estimée sur un total de 100 baies par traitement et à raison de 50 baies par face (Est ou Ouest).

L'ensemble des résultats a été analysé à l'aide du programme de statistique STATISTICA (version 5.1 Edition 97, STATSOFT), et notamment par l'utilisation de tests multiparamétriques : le test de Newmans-Keuls et le test de Duncan dont les seuils d'erreur alpha sont $\leq 0,05$.

CHAPITRE 1

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE *B. CINEREA* A L'AIDE DE BACTERIES ISOLEES DU VIGNOBLE ET MARQUEURS DE DEFENSE DE LA VIGNE

CHAPITRE 1

Lutte biologique contre *B. cinerea* à l'aide de bactéries isolées du vignoble et marqueurs de défense de la vigne

1 Introduction

De nombreuses recherches ont montré que des bactéries non-phytopathogènes, issues de la phyllosphère, de la rhizosphère ou endophytiques, sont capables d'inhiber le développement de différents pathogènes. Ces bactéries peuvent agir sur le contrôle des organismes pathogènes par deux types d'actions, soit de manière directe par antibiose, parasitisme ou compétition, soit de manière indirecte *via* l'induction d'une résistance de la plante appelée communément résistance systémique induite (ISR). Cette résistance peut relever de la stimulation de différents mécanismes de défense de la plante (renforcement des parois, phytoalexines et protéines PR) (Maurhöfer *et al.*, 1994 ; Ramamoorthy *et al.*, 2001 ; Tjamos *et al.*, 2005).

Il est bien établi que la vigne répond aux agressions des pathogènes par la mise en place de réactions de défense variées. Les plus connues de ces réactions sont l'accumulation ou l'activation des protéines PR, dont certaines sont capables de lyser les constituants pariétaux des microorganismes, et l'accumulation de phytoalexines, résultant de l'activation de la voie des phénylpropanoïdes et connues pour leur activité antimicrobienne (Liswidowati *et al.*, 1991 ; Adrian *et al.*, 1997 ; Busam *et al.*, 1997 ; Derckel *et al.*, 1998b ; Giannakis *et al.*, 1998 ; Bézier *et al.*, 2002 ; Jeandet *et al.*, 2002 ; Robert *et al.*, 2002 ; Kortekamp, 2006). Certaines de ces réactions sont également induites par des macromolécules issues de paroi d'algues, d'agents pathogènes ou de plantes supérieures (Aziz *et al.*, 2003 ; 2004 ; Poinssot *et al.*, 2003) ou encore en réponse aux UV (Bonomelli *et al.*, 2004). Une forte expression de ces réactions est souvent associée à une résistance de la vigne vis-à-vis de certains pathogènes (Aziz *et al.*, 2003 ; 2004 ; Bonomelli *et al.*, 2004 ; Elmer et Reglinski, 2006 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2006). D'autres produits comme le BABA ont fait preuve de nombreuses démonstrations chez la vigne, tant sur le plan de leur implication dans l'induction de certaines réactions de défense (accumulation de lignine et de callose, HR, protéines PR et expression de gènes *LOX*-

9 et PR-4), que sur le plan de la protection contre différents pathogènes (Cohen *et al.*, 1999 ; Oostendorp *et al.*, 2001 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005a).

Les travaux réalisés sur une bactérie de type PGPR, *Burkholderia* PsJN, isolée de la rhizosphère de l'oignon (Ait Barka *et al.*, 2002 ; Compant *et al.*, 2005) ont montré que la protection de la vigne contre *B. cinerea* serait associée au caractère endophyte de cette bactérie et à la colonisation de différents tissus de la plante. Depuis quelques années, on assiste également à l'utilisation de nouveaux produits à base de *B. subtilis* QST713 (Serenade®) et de *P. fluorescens* A506 (Blightban®) dans la lutte contre divers pathogènes chez la vigne (<http://ipm.msu.edu>). Il a également été rapporté que les microorganismes originaires de la rhizosphère d'une plante sont considérés plus adaptés à cette plante et peuvent ainsi procurer un état de résistance et de protection plus important que ceux originaires d'une autre plante (Cook, 1993).

Récemment, différentes souches bactériennes ont été isolées à partir de la rhizosphère et de différentes parties de la vigne. Ces souches ont été caractérisées comme agents de la lutte efficace contre *B. cinerea* dans des conditions *in vitro* et identifiées comme *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et PTA-152, *Bacillus subtilis* PTA-271, *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 et *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 (Trotel-Aziz *et al.*, 2007). Les effets protecteurs observés semblent être liés pour une grande part à un effet inducteur de certaines réactions de défense de la vigne.

Ce travail a pour but de comparer l'efficacité des sept souches identifiées dans la protection de la vigne contre *B. cinerea* dans les conditions du vignoble dont elles sont originaires. Ces bactéries ont été appliquées en souches pures au vignoble selon trois modalités différentes dans une parcelle localisée à Cernay-les-Reims (infiltration dans les bourgeons, pulvérisation sur les feuilles et application au sol) et uniquement par application au sol dans une autre parcelle localisée à Nogent l'Abbesse (NL). Un suivi des réactions de défense (activités chitinase, β -1,3-glucanase et PAL) a été réalisé sur feuilles et sur baies à différents stades de développement de la vigne. Afin d'évaluer la durabilité de l'effet protecteur de la vigne contre *B. cinerea*, des mesures ont également été effectuées en 2005 sans renouveler l'application des bactéries au vignoble.

2 Résultats

2.1 Evaluation de la protection de la vigne contre *B. cinerea*

2.1.1 Comparaison de différentes méthodes d'application des bactéries au vignoble

Les bactéries sélectionnées sont deux *A. lwoffii* PTA-113 et PTA-152, une *B. subtilis* PTA-271, deux *P. agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 et deux *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2. Ces bactéries ont été multipliées et appliquées au vignoble (CR) en 2003 et en 2004 selon trois modalités différentes : par infiltration dans les bourgeons (1 ml par bourgeons à raison de 10 bourgeons par plante), par pulvérisation (100 ml par plante) ou par apport au sol (200 ml par plante). En 2005, aucune application de bactéries n'a été effectuée. Ces essais ont été réalisés dans une parcelle caractérisée généralement par une forte pression de *B. cinerea*. Dans tous les cas, les tests de protection ont été réalisés sur des feuilles prélevées au vignoble (deux mois après l'application des bactéries), puis inoculées artificiellement par *B. cinerea* en conditions contrôlées.

a. Suite à l'application annuelle des bactéries

En 2004, les bactéries ont été appliquées le 13 mai et les feuilles ont été prélevées le 13 juillet, puis inoculées avec *B. cinerea*. La contamination est déterminée par mesure de la taille de la nécrose après 7 jours d'inoculation.

Infiltration des bactéries

En réponse à l'application de la majorité des bactéries par infiltration dans les bourgeons, la protection contre *B. cinerea* s'est révélée significative. Les deux *P. fluorescens* PTA-CT2 et PTA-268 ont permis d'obtenir une protection des feuilles d'environ 20 à 30%. Cette protection est plus élevée en réponse aux souches *A. lwoffii* PTA-152 et *P. agglomerans* PTA-AF1 ; elle atteint des valeurs de l'ordre de 40 à 50%. Les niveaux de protection obtenus avec les trois autres souches (*A. lwoffii* PTA-113, *B. subtilis* PTA-271 et *P. agglomerans* PTA-AF2) ne sont pas significativement différents par rapport au témoin non bactérisé (Figure 1 A).

Pulvérisation sur les feuilles

La taille de la nécrose induite par *B. cinerea* est significativement réduite chez les feuilles issues des vignes traitées par *P. fluorescens* PTA-CT2 (réduction de 39%) et *P. agglomerans*

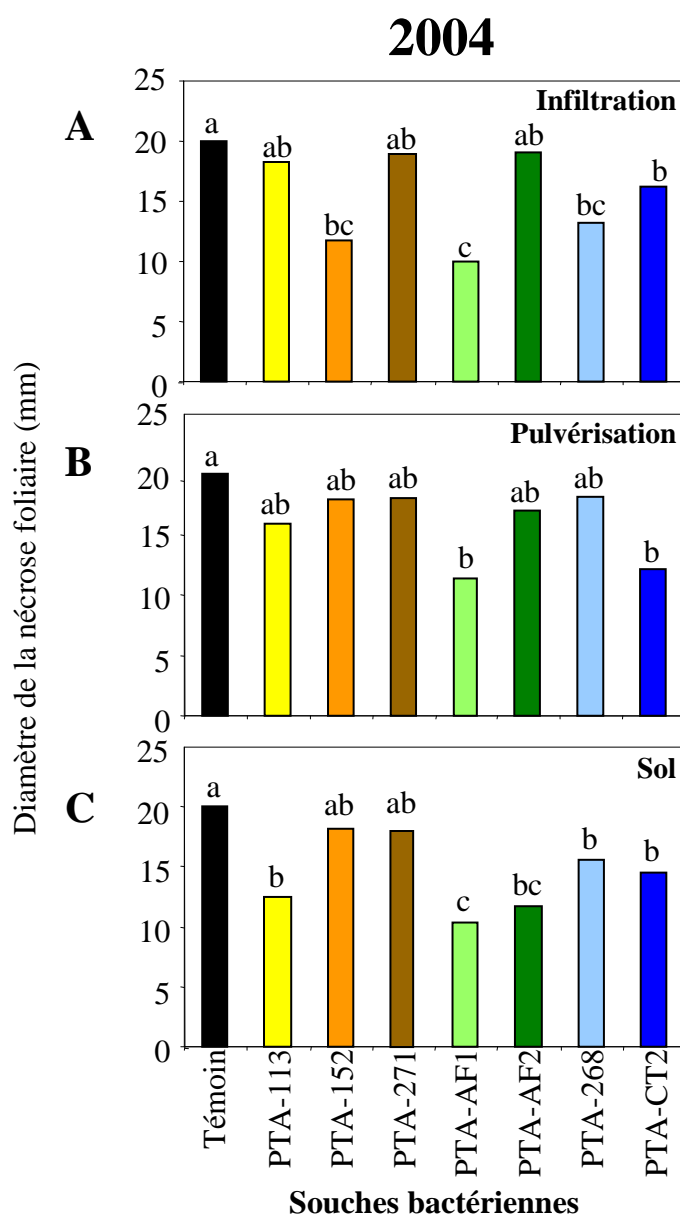


Figure 1 : Protection des feuilles de vigne contre *B. cinerea* par différentes bactéries sélectionnées en relation avec leur méthode d'application. Les essais ont été réalisés en 2004. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées au vignoble (CR) à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} par infiltration (A), pulvérisation (B) ou par dépôt au sol (C) en début de saisons 2003 et 2004. Les tests de protection ont été réalisés deux mois après l'application des bactéries au vignoble (stade "grains taille d'un petit pois" – 13 juillet 2004). Les feuilles ont été prélevées puis inoculées artificiellement au laboratoire avec une suspension conidienne de *B. cinerea* à 1×10^5 spores ml^{-1} . La contamination des feuilles (diamètre de la nécrose) a été estimée 7 j post-inoculation. Les valeurs représentent les moyennes des nécroses sur 20 à 30 feuilles par traitement. Les histogrammes ayant la même lettre ne sont pas significativement différents d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

PTA-AF1 (réduction de 43%) (Figure 1 B). La pulvérisation des cinq autres souches bactériennes conduit seulement à un effet protecteur modéré (Figure 1 B).

Application au sol

L'application des bactéries au sol conduit à des effets similaires par rapport à l'infiltration des bactéries dans les bourgeons. En effet, pour la plupart des souches étudiées, la modalité sol s'est traduite par une protection des feuilles comprise entre 28 et 50%. Les souches les plus actives sont représentées par *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 (de l'ordre de 27% de protection), *A. lwoffii* PTA-113 (38%) et *P. agglomerans*, PTA-AF1 (50%) et PTA-AF2 (42%) (Figure 1 C). *A. lwoffii* PTA-152 et *B. subtilis* PTA-271 sont moins efficaces.

Quelle que soit la méthode d'application, *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. fluorescens* PTA-CT2 protègent significativement les feuilles contre *B. cinerea*. La protection obtenue à l'aide de *P. agglomerans* PTA-AF1 est plus importante lorsque la bactérie est infiltrée au niveau des bourgeons ou apportée au sol. Cependant, en présence de *B. subtilis* PTA-271 le niveau de contamination par *B. cinerea* est identique à celui des témoins non bactérisés.

b. En l'absence de renouvellement annuel de traitement bactérien

En 2005, l'application des bactéries n'a pas été renouvelée, mais les tests de protection ont été réalisés sur des feuilles issues de plants traités au cours des années précédentes (2003 et 2004) (Figure 2). Les feuilles ont été prélevées le 26 juillet 2005 et la protection a été estimée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Infiltration des bactéries

Les feuilles prélevées des plantes préalablement inoculées par infiltration avec *B. subtilis* PTA-271 et *P. agglomerans* PTA-AF1 montrent une forte réduction des symptômes causés par *B. cinerea* pouvant atteindre 75% (Figure 2A). Les plantes traitées avec *A. lwoffii* PTA-152 et *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2, montrent des niveaux de protection légèrement supérieurs à ceux observés en 2004 (de l'ordre de 47 à 57% de protection), alors que celles traitées avec *A. lwoffii* PTA-113 et *P. agglomerans* PTA-AF2 ne montrent aucune différence significative par rapport au témoin.

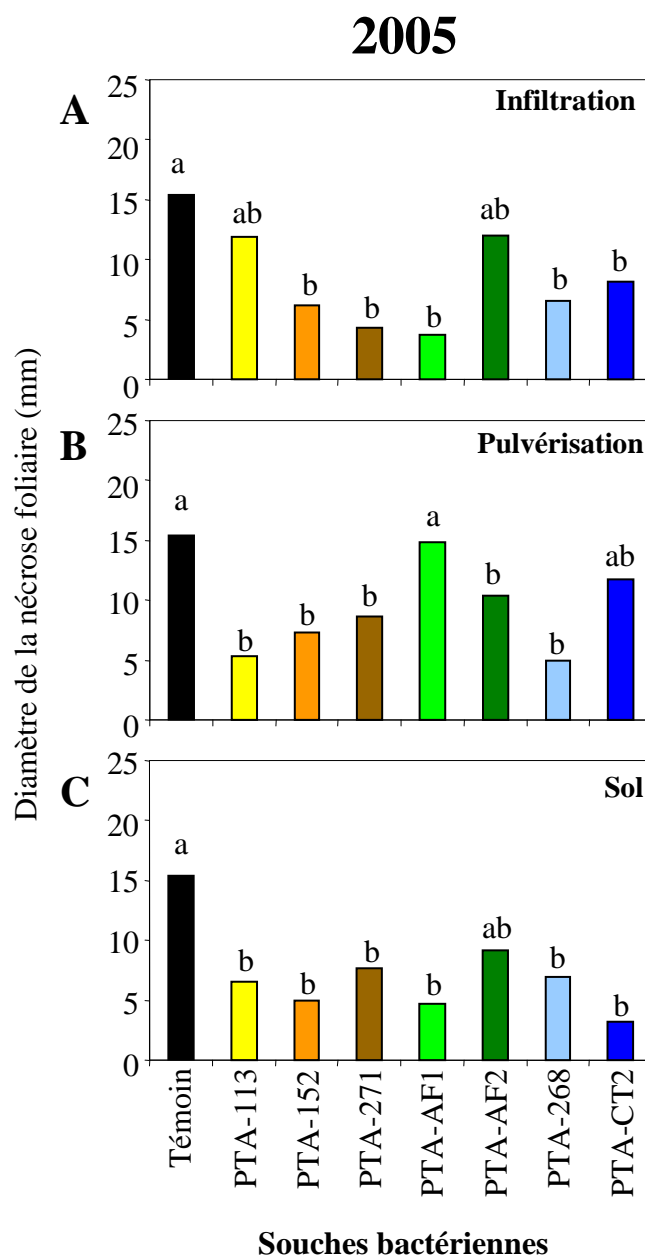


Figure 2 : Protection des feuilles de vigne contre *B. cinerea* en 2005. Les essais ont été réalisés en 2005, en l'absence d'un renouvellement des traitements. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1 ; *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées au vignoble (CR) en début de saisons 2003 et 2004 à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} par infiltration (A), pulvérisation (B) ou par dépôt au sol (C). Les tests de protection ont été réalisés au stade "grains taille d'un petit pois" – 26 juillet 2005. Les feuilles ont été prélevées puis inoculées artificiellement au laboratoire avec une suspension conidienne de *B. cinerea* à 1×10^5 spores ml^{-1} . La contamination des feuilles (diamètre de la nécrose) a été estimée 7 j post-inoculation. Les valeurs représentent les moyennes des nécroses sur 20 à 30 feuilles par traitement. Les histogrammes ayant la même lettre ne sont pas significativement différents d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Pulvérisation sur les feuilles

Les feuilles isolées des vignes précédemment pulvérisées par *A. lwoffii* PTA-113 et par *P. fluorescens* PTA-268 montrent une réduction importante de la taille des nécroses (d'environ 66%). Un effet protecteur significatif contre *B. cinerea* a également été observé chez les plantes traitées avec *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271 et *P. agglomerans* PTA-AF2 (de l'ordre de 32 à 53%), alors que les plantes pulvérisées par *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ne montrent pas de réduction des symptômes par rapport au témoin (Figure 2 B).

Application au sol

Les feuilles isolées à partir de plantes dont le sol a été préalablement enrichi avec des suspensions bactériennes montrent une réduction significative des symptômes de *B. cinerea*. Cette réduction est très forte en présence d'*A. lwoffii* PTA-152, de *P. agglomerans* PTA-AF1 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 ; elle atteint 67 à 78% par comparaison au témoin. Une protection de l'ordre de 49 à 57% a également été observée chez les plantes traitées par *A. lwoffii* PTA-113, *B. subtilis* PTA-271 et *P. fluorescens* PTA-268 (Figure 2 C). Dans les mêmes conditions, seule la souche *P. agglomerans* PTA-AF2 s'est montrée moins efficace en 2005.

Il ressort de ces tests que les niveaux de protection des feuilles obtenus en 2005 sont supérieurs à ceux de 2004 quel que soit le mode d'application des bactéries. Pour la majorité des souches testées, l'application au sol semble plus efficace en terme de protection des feuilles contre *B. cinerea*.

2.1.2 Evaluation de la résistance systémique induite par les bactéries

Afin d'évaluer l'effet systémique des bactéries chez la vigne, des essais de protection contre *B. cinerea* ont été réalisés à la fois sur les feuilles et sur les baies après application des bactéries au niveau du sol dans une deuxième parcelle (NL) en 2004. Ces essais ont également été réalisés en 2005 sans renouvellement des traitements.

a. Effet des bactéries sur la résistance des feuilles à *B. cinerea*

Suite à l'application des bactéries en 2004

Les tests de protection ont été réalisés sur des feuilles prélevées au vignoble en 2004 puis inoculées par une suspension conidienne de *B. cinerea* au laboratoire. Les essais ont montré que l'enrichissement du sol par des bactéries se traduit par une réduction significative de l'infection des feuilles par *B. cinerea* (Figure 3 A). Les souches *A. lwoffii* PTA-113 et PTA-152, *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 induisent une réduction de la maladie d'environ 45 à 70%. Les deux souches de *P. agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 conduisent aussi à une réduction des symptômes, alors que *B. subtilis* PTA-271 reste moins efficace (Figure 3 A). Ces résultats sont confortés par ceux obtenus suite à l'application des bactéries au sol sur la parcelle CR (Figure 1 C) ; à l'exception de la souche *P. agglomerans* PTA-AF2 qui ne permettait pas de protéger significativement les feuilles contre *B. cinerea*.

En l'absence d'application des bactéries en 2005

Les tests de protection ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment sur des feuilles issues de plantes ayant reçues des bactéries les années précédentes. La réduction de la nécrose foliaire observée en 2005 est relativement similaire à celle obtenue en 2004. Les feuilles prélevées à partir de plantes dont le sol a été enrichi avec *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 expriment une forte résistance à *B. cinerea*. Une réduction de la taille de la nécrose a également été observée chez les feuilles des plantes ayant été mises en contact avec *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152 et *B. subtilis* PTA-271. Quant aux feuilles des plantes traitées par *P. agglomerans* PTA-AF2, elles ne montrent pas de résistance à *B. cinerea* (Figure 3 B). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans la parcelle CR suite à l'application des bactéries au sol (Figure 2 C). *P. agglomerans* PTA-AF2 ne montrait pas non plus d'activité protectrice significative contre *B. cinerea*.

b. Effet des bactéries sur la résistance des baies à *B. cinerea*

En 2003, aucune contamination des baies par *B. cinerea* n'a été observée en Champagne. La capacité protectrice des différentes bactéries appliquées au sol contre *B. cinerea* est évaluée *via* la détermination du pourcentage de contamination des baies dans les conditions du vignoble en 2004 et en 2005 (Tableaux I et II). En 2004, le comptage a été réalisé en fin de

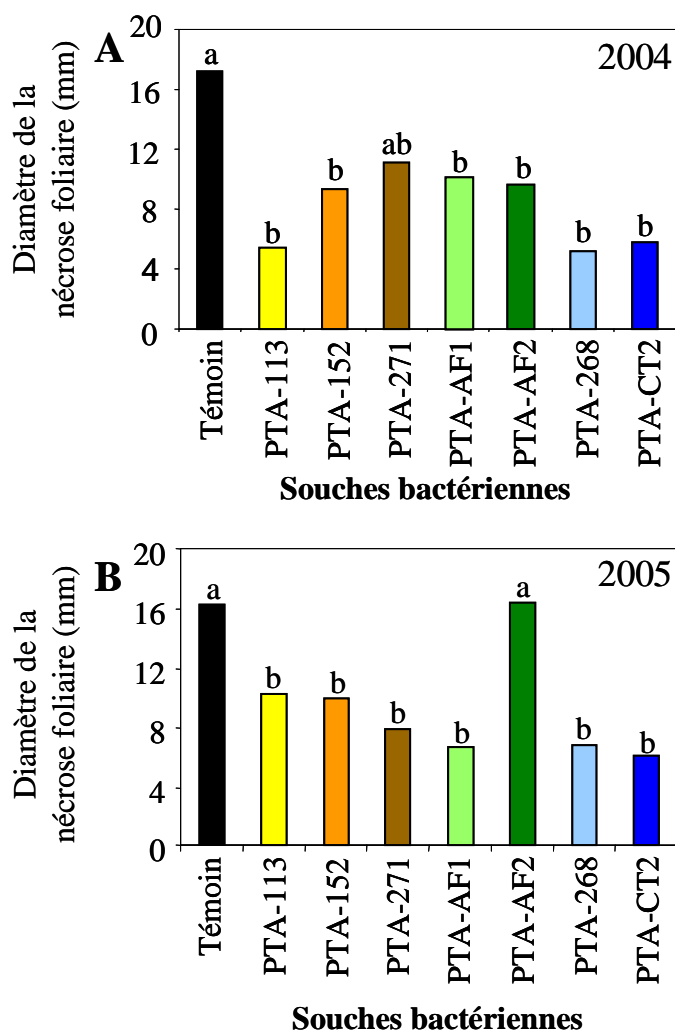


Figure 3 : Protection des feuilles de vigne contre *B. cinerea* par différentes bactéries issues du vignoble. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées au sol à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} en 2003 et en 2004 dans une parcelle à Nogent l'Abbesse (NL). En 2005, aucun traitement bactérien n'a été renouvelé. Les feuilles de vigne ont été prélevées le 17 juillet 2004 (soit deux mois après la dernière application) (A) et le 21 juillet 2005 (stade "grains taille d'un petit pois") (B). Les feuilles ont ensuite été inoculées au laboratoire avec une suspension conidienne de *B. cinerea* à 1×10^5 spores ml^{-1} . La contamination des feuilles (diamètre de la nécrose) a été estimée 7 j post-inoculation. Les valeurs représentent les moyennes des nécroses sur 20 à 30 feuilles par traitement. Les histogrammes ayant la même lettre ne sont pas significativement différents d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

maturation des baies (28 octobre 2004), compte tenu d'une faible pression parasitaire au moment de la récolte. En 2005, les attaques des baies par *B. cinerea* ont été plus précoces qu'en 2004. L'estimation de l'intensité de contamination des baies a pu être réalisée en pleine maturation (21 septembre 2005), soit deux jours avant les vendanges.

Suite à l'application des bactéries en 2004

Chez les plantes témoin (non bactérisées), une moyenne de 44,7% de contamination des baies par grappe a été observée en 2004 (Tableau I). Elle consiste en 35% des baies infectées dans les grappes situées sur le côté Est et de 54,5% sur le côté Ouest des rangs. Les grappes des plantes traitées par les bactéries montrent une certaine hétérogénéité en terme de contamination dans les conditions du vignoble. Seules les souches *P. agglomerans* conduisent à une protection significative d'environ 26% (Tableau I). *P. agglomerans* PTA-AF1 est plus efficace sur le côté Est avec une protection des baies de 40%, contre 12,5% sur le côté Ouest. Les traitements à l'aide de *P. agglomerans* PTA-AF2 se traduisent aussi par une réduction des symptômes de la pourriture grise seulement sur la face Ouest (26% de protection). Les plantes traitées avec les autres souches montrent un pourcentage d'infection similaire, voire supérieur à celui des témoins.

En l'absence d'application des bactéries en 2005

Chez les plantes témoin, la contamination des baies par *B. cinerea* en 2005 est d'environ 14% (Tableau II). Elle est moins importante que celle observée en 2004. Dans ces conditions, les grappes montrent un degré d'infection similaire entre la face Est et la face Ouest (Tableau II). La majorité des traitements bactériens se traduit par une réduction significative de la pourriture grise, en particulier sur le côté Est (42 à 64% de protection).

Les plantes ayant été traitées avec *A. lwoffii* PTA-113 et *P. agglomerans* PTA-AF2 montrent une forte protection contre *B. cinerea* (62 à 64%). Cette protection est relativement comparable chez les grappes situées sur les deux faces des rangs. Les plantes dont le sol a été enrichi avec *A. lwoffii* PTA-152 et *P. agglomerans* PTA-AF1 montrent aussi une réduction des symptômes d'environ 40 à 44%, en particulier sur le côté Est. Sur l'ensemble des grappes, *B. subtilis* et *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 conduisent à une protection relativement faible (Tableau II). En revanche, en présence de *B. subtilis* et de *P. fluorescens* PTA-CT2, les grappes situées sur le côté Est montrent une forte résistance à *B. cinerea* (42% et 72%).

Tableau I : Effet des bactéries isolées du vignoble sur la protection des baies contre *B. cinerea*. Les essais ont été réalisés dans la parcelle NL en 2004. Les bactéries ont été appliquées au niveau du sol à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} en début de saisons 2003 et 2004. L'intensité de la contamination des baies par *B. cinerea* a été déterminée en fin de maturation (28 octobre 2004) sur 100 grappes par traitement (50 grappes sur face Est et 50 grappes sur face Ouest). Les valeurs (moyennes) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan ($p < 0,05$, analyse de variance par colonne).

2004			
Souches bactériennes	Contamination des baies (%)		
	Totale	Face Est	Face Ouest
Témoin	44,7 a	34,9 a	54,5 a
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	46,9 a	35,6 a	58,3 a
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	48,6 a	41,1 a	56,0 a
<i>B. subtilis</i> PTA-271	47,2 a	34,7 a	59,8 a
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	34,0 b	20,3 b	47,7 b
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	37,2 ab	33,9 ab	40,2 b
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	54,7 a	39,4 a	70,0 a
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	58,4 a	48,8 a	68,0 a

Tableau II : Protection des baies contre *B. cinerea* chez des plants de vigne ayant été traitées par des bactéries issues du vignoble. Les essais ont été réalisés dans la parcelle NL en 2005. Les bactéries ont été appliquées au niveau du sol à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} en début de saisons 2003 et 2004. L'intensité de la contamination des baies par *B. cinerea* a été déterminée à la maturation (21 septembre 2005) sur 100 grappes par traitement (50 grappes sur face Est et 50 grappes sur face Ouest). Les valeurs (moyennes) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan ($p < 0,05$, analyse de variance par colonne).

2005			
Souches bactériennes	Contamination des baies (%)		
	Totale	Face Est	Face Ouest
Témoin	13,4 a	13,3 a	13,5 a
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	4,8 b	4,6 b	5,1 b
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	7,9 b	4,6 b	11,2 ab
<i>B. subtilis</i> PTA-271	9,8 ab	7,7 b	11,9 ab
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	7,5 b	5,3 b	9,8 ab
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	5,1 b	5,3 b	4,9 b
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	14,5 a	10,6 ab	18,4 a
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	8,5 ab	3,7 b	13,4 a

2.2 Effet des bactéries sur les réactions de défense de la vigne

2.2.1 Effet des méthodes d'application des bactéries sur les réactions de défense de la vigne

Trois méthodes d'application des bactéries ont été comparées en terme d'activation des réactions de défense dans les feuilles et dans les baies de vigne. Elles consistent à infiltrer les bactéries dans les bourgeons, à les pulvériser sur le feuillage et à enrichir le sol avec ces sept bactéries.

a. Activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles suite à l'application des bactéries

En 2003, les activités chitinase et β -1,3-glucanase des feuilles ont été suivies à différents stades du développement de la vigne à la fois chez le témoin et chez les plantes bactérisées.

Activité chitinase

Chez les plantes non traitées, aucune augmentation de l'activité chitinase n'a été décelée avant le 28 juillet (stade "fermeture de la grappe"). L'activité chitinase est d'environ $1 \text{ mg min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$. A la véraison, l'activité chitinase diminue et retourne à son niveau de base (Figure 4).

Le niveau de l'activité chitinase dépend à la fois de la souche bactérienne et du mode d'application de la bactérie. L'application de *A. lwoffii* PTA-113 par pulvérisation et au sol se traduit par une forte stimulation de l'activité chitinase au moment de la fermeture de la grappe (Figure 4 A et B). Une activité transitoire a également été observée par infiltration d'*A. lwoffii* PTA-152 (Figure 4 B) le 10 juillet, puis par pulvérisation et dépôt au sol de la bactérie à la fin août. Dans le cas de *B. subtilis*, l'activité chitinase est stimulée dès les premiers stades de développement et de manière transitoire (Figure 4 C), en particulier lorsque la bactérie est infiltrée dans les bourgeons ou apportée au sol. Les deux souches de *P. agglomerans* PTA-AF1 (Figure 4 D) et PTA-AF2 (Figure 4 E) ne conduisent pas au même niveau d'activité de chitinase dans les feuilles. En effet, seules les plantes traitées par pulvérisation ou par apport au sol de *P. agglomerans* PTA-AF2 expriment une forte activité chitinase, en particulier au moment de la fermeture de la grappe (10-28 juillet) (Figure 4 E). Quant aux *P. fluorescens* PTA-268 (Figure 4 F) et PTA-CT2 (Figure 4 G), elles se montrent capables

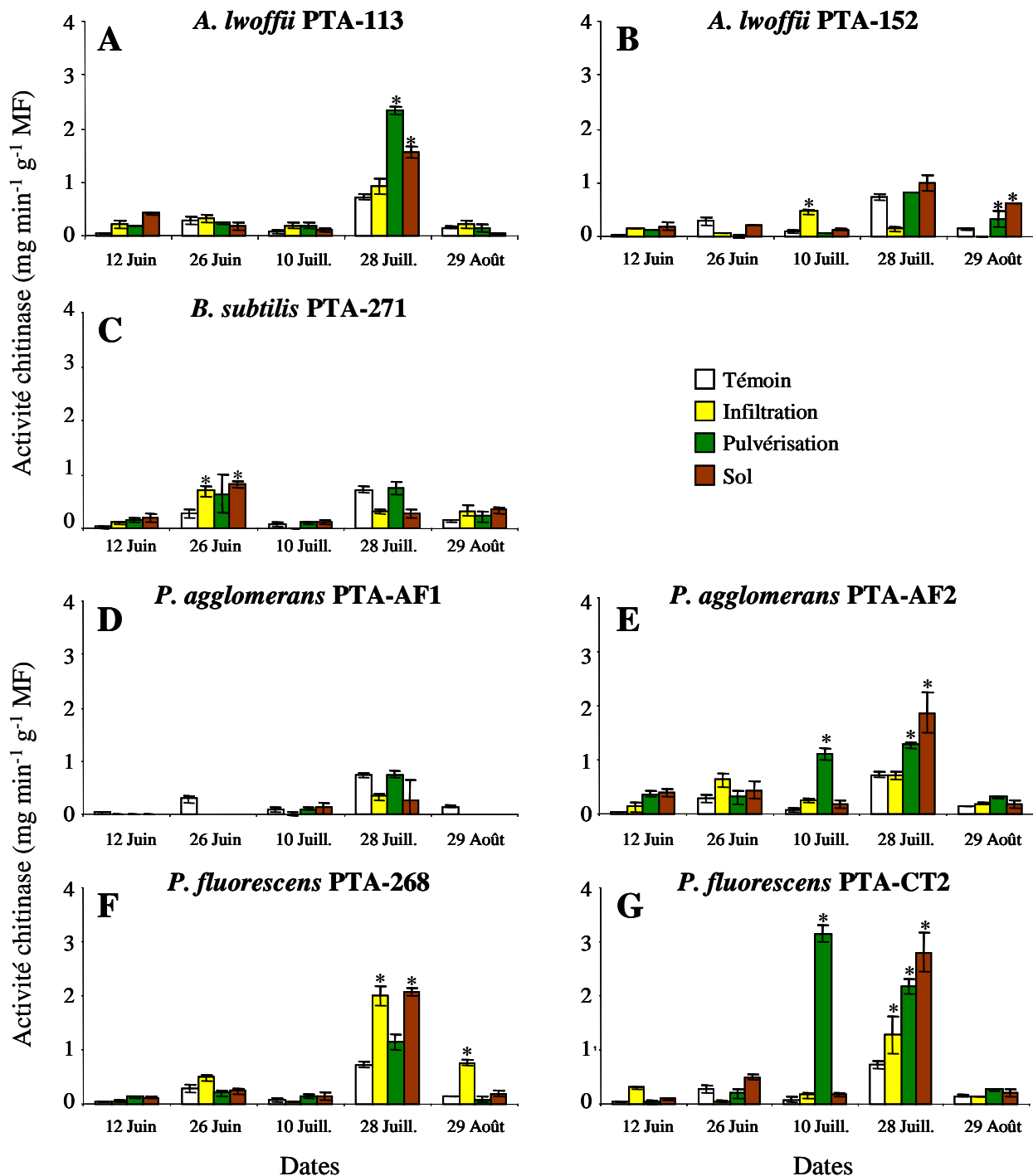


Figure 4 : Activité chitinase dans les feuilles de vigne suite à l'application des bactéries par infiltration, pulvérisation et au sol au vignoble. Les mesures ont été réalisées en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113 (A), *A. lwoffii* PTA-152 (B), *B. subtilis* PTA-271 (C), *P. agglomerans* PTA-AF1 (D), *P. agglomerans* PTA-AF2 (E), *P. fluorescens* PTA-268 (F) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (G) ont été appliquées sur la parcelle CR à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} par infiltration, pulvérisation ou par dépôt au sol le 25 mai 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

de stimuler l'activité chitinase, quelle que soit la méthode de leur application. Cette activité est d'environ 4 fois supérieure à celle du témoin. Toutefois, la souche la plus active est *P. fluorescens* PTA-CT2, notamment lorsqu'elle est appliquée par pulvérisation ou au sol (Figure 4 G).

Parmi les 7 souches étudiées, *A. lwoffii* PTA-113, *P. agglomerans* PTA-AF2 et les deux *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 semblent plus efficaces en terme de stimulation de l'activité chitinase dans les feuilles. La pulvérisation et l'apport des bactéries au sol semblent plus efficaces. Dans tous les cas, quelle que soit la souche, l'activité chitinase diminue fortement dans les feuilles après la véraison (Figure 4).

Activité β -1,3-glucanase

Dans les mêmes conditions que précédemment, l'activité β -1,3-glucanase des feuilles a été déterminée au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet) et à la fin de la véraison (début septembre). Chez les plantes non traitées, au stade "fermeture de la grappe", l'activité β -1,3-glucanase est de l'ordre de 2,2 unités. Elle augmente d'un facteur de 4,7 à la véraison (Figure 5). L'application de bactéries se traduit en général par une stimulation de l'activité β -1,3-glucanase au moment de la fermeture de la grappe, alors qu'elle diminue au moment de la véraison (Figure 5). Parmi les deux souches d'*A. lwoffii*, seule l'application de PTA-152 par infiltration conduit à une légère stimulation de l'activité β -1,3-glucanase au stade "fermeture de la grappe" (Figure 5 B). A ce stade, *B. subtilis* PTA-271 conduit aussi à une forte activité de β -1,3-glucanase, lorsqu'elle est appliquée par infiltration (Figure 5 C). Quant aux souches de *P. agglomerans*, les trois méthodes d'application de celles-ci se traduisent par une stimulation significative de l'activité β -1,3-glucanase (Figure 5 D et E). Une augmentation de l'activité β -1,3-glucanase a également été observée suite à l'application de *P. fluorescens* PTA-CT2 par infiltration (Figure 5 G), alors que *P. fluorescens* PTA-268 ne montre aucun effet sur cette activité (Figure 5 F).

b. Activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les baies

Dans les baies, les mesures ont été réalisées à trois stades de développement de la vigne : "fermeture de la grappe" (fin juillet), début de véraison (mi-août) et fin de véraison (début septembre).

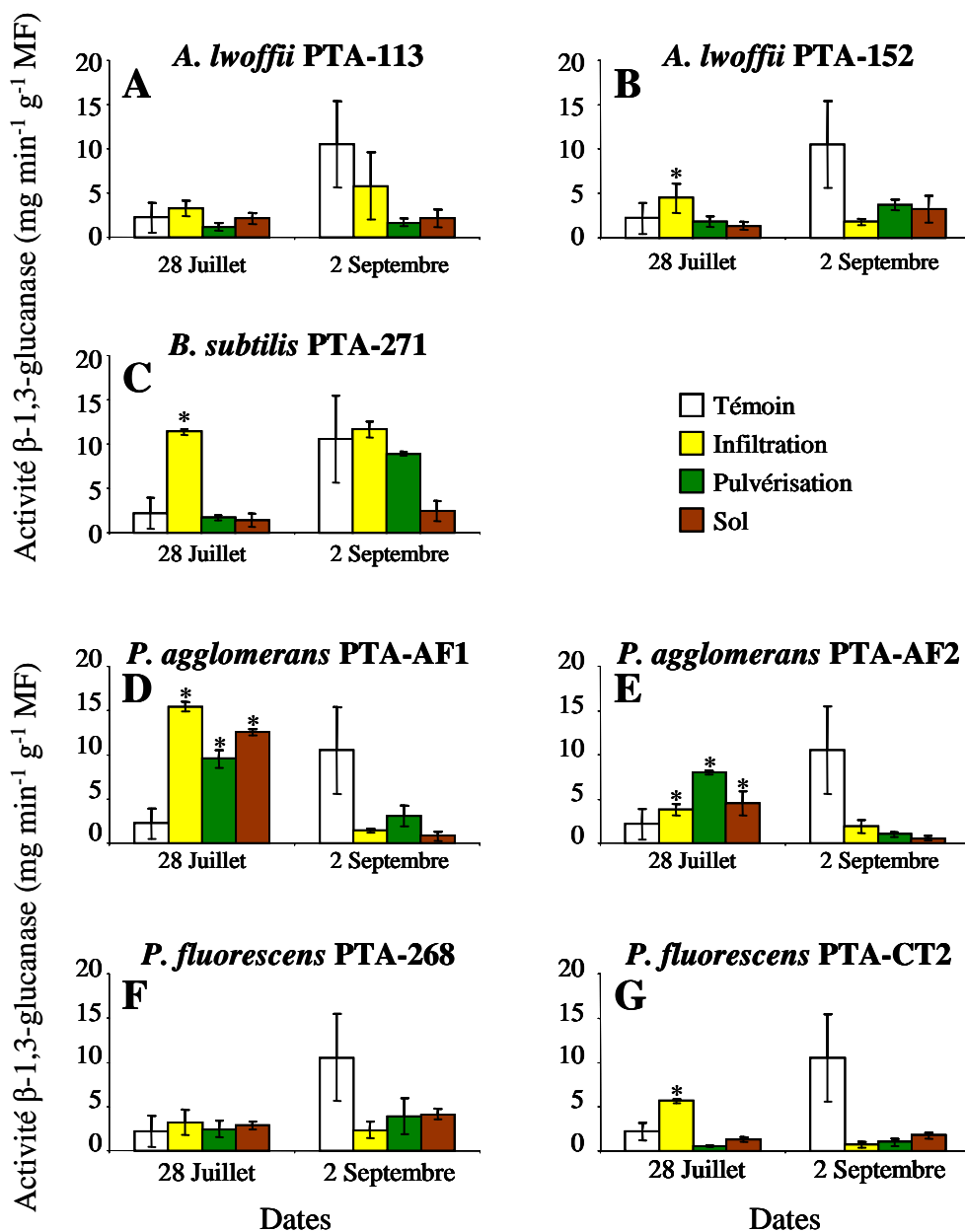


Figure 5 : Activité β -1,3-glucanase dans les feuilles de vigne suite à l'application des bactéries par infiltration, pulvérisation et au sol au vignoble. Les mesures ont été réalisées en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113 (A), *A. lwoffii* PTA-152 (B), *B. subtilis* PTA-271 (C), *P. agglomerans* PTA-AF1 (D), *P. agglomerans* PTA-AF2 (E), *P. fluorescens* PTA-268 (F) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (G) ont été appliquées sur la parcelle CR à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} par infiltration, pulvérisation ou par dépôt au sol le 25 mai 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Activité chitinase

Chez les plantes témoins, aucune augmentation de l'activité chitinase n'a été détectée dans les baies avant la fin de véraison (début septembre). A ce stade, l'activité atteint un niveau d'environ 9 fois supérieur par rapport à son niveau initial (Figure 6). L'application des bactéries en 2003 se traduit en général par une stimulation de l'activité chitinase dans les baies. L'amplitude de cette réaction dépend à la fois de la souche inoculée et de la méthode de son application.

Les plantes traitées à l'aide d'*A. lwoffii* PTA-113 par dépôt au sol montrent une augmentation de l'activité chitinase (de 7 fois par rapport au témoin) dans les baies dès le début de la véraison. Après ce stade, l'activité chitinase reste élevée mais équivalente au témoin. L'application d'*A. lwoffii* PTA-113 par infiltration ou par pulvérisation ne montre pas d'effet significatif sur cette réaction. En revanche, l'infiltration d'*A. lwoffii* PTA-152 se traduit par une légère et précoce stimulation de l'activité chitinase (Figure 6 B).

L'utilisation de *B. subtilis* par voie d'infiltration ou par application au sol conduit à une augmentation du niveau de l'activité chitinase au début de la véraison (mi-août). Cette activité est maintenue jusqu'à la fin de la véraison et reste équivalente à celle des plantes non-traitées, quelque soit la méthode d'application de la bactérie (Figure 6 C).

C'est également le cas en réponse à l'application des *P. agglomerans* PTA-AF1 (Figure 6 D) et PTA-AF2 (Figure 6 E), où l'activité chitinase est particulièrement stimulée lorsque le traitement est effectué respectivement par pulvérisation et par application au sol. Quant aux plantes traitées avec *P. fluorescens* (Figures 6 F, G), elles n'expriment qu'une faible stimulation de l'activité chitinase dans les baies au cours des deux premiers stades, en particulier suite à l'infiltration et la pulvérisation de *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 6 G)

A l'exception de *P. fluorescens* PTA-268, les souches bactériennes sélectionnées semblent stimuler l'activité chitinase dans les baies à des niveaux relativement faibles. Néanmoins, *A. lwoffii* PTA-113 semble être la plus efficace, en particulier lorsqu'elle est appliquée au niveau du sol (Figure 6).

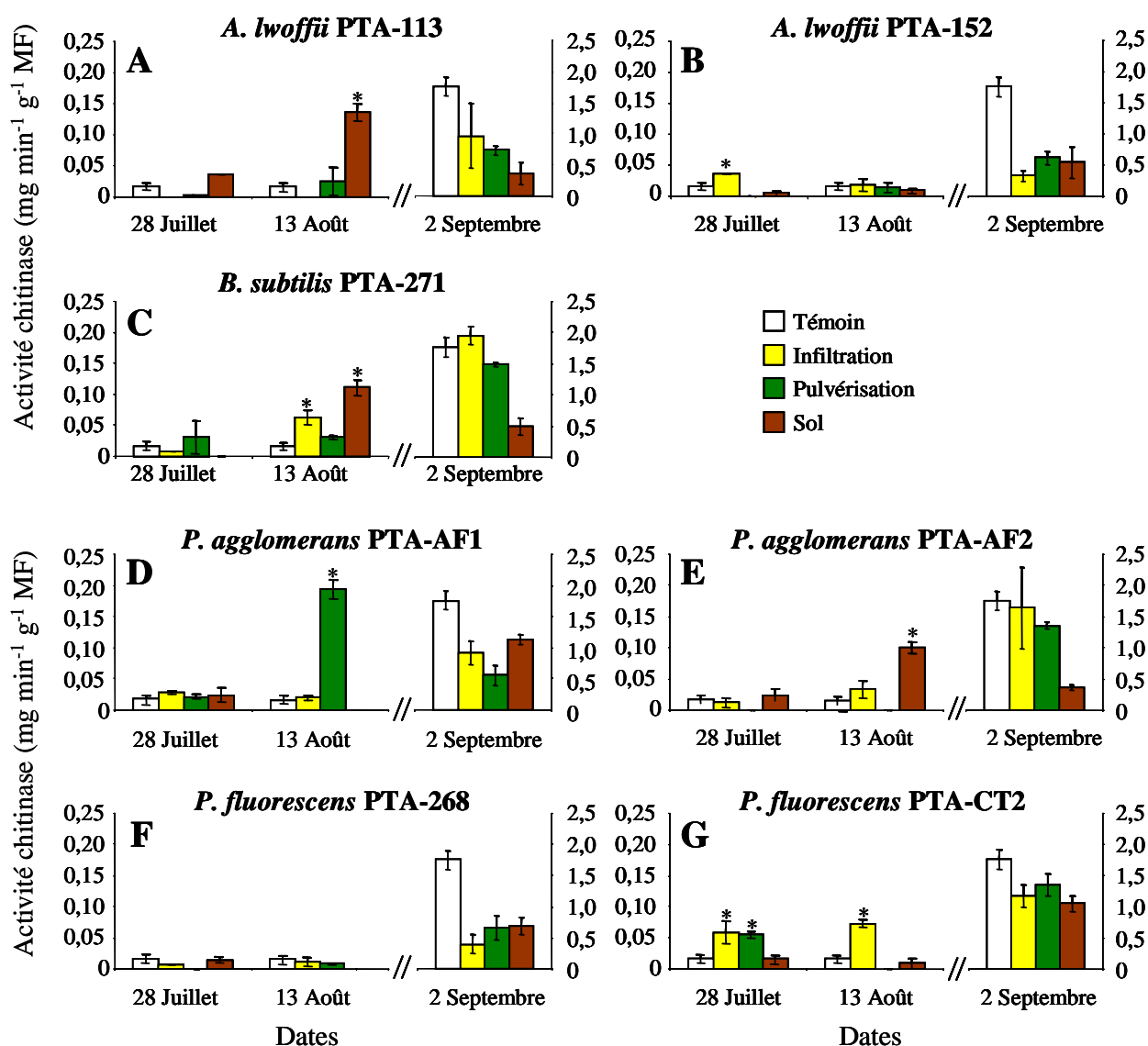


Figure 6 : Activité chitinase dans les baies de vigne suite à l'application des bactéries par infiltration, pulvérisation et au sol au vignoble. Les mesures ont été réalisées en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113 (A), *A. lwoffii* PTA-152 (B), *B. subtilis* PTA-271 (C), *P. agglomerans* PTA-AF1 (D), *P. agglomerans* PTA-AF2 (E), *P. fluorescens* PTA-268 (F) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (G) ont été appliquées sur la parcelle CR à une concentration de 10⁸ UFC ml⁻¹ par infiltration, pulvérisation ou par dépôt au sol le 25 mai 2003. Les valeurs représentent les moyennes (n=3) ± l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Activité β -1,3-glucanase

En 2003, l'activité β -1,3-glucanase est relativement faible chez les plantes témoins et diminue même fortement à la fin de la véraison (Figure 7). L'application des bactéries se traduit par une stimulation de l'activité β -1,3-glucanase au moment de la "fermeture de la grappe". L'infiltration des deux *A. lwoffii* PTA-113 (Figure 7 A), PTA-152 (Figure 7 B) et de *B. subtilis* (Figure 7 C) stimule significativement l'activité β -1,3-glucanase dans les baies. Cette activité peut atteindre un niveau 9 fois supérieur à celui du témoin en réponse à *B. subtilis* (Figure 7 C). Au même stade, une augmentation de l'activité de cette enzyme a également été observée suite à l'application de *P. agglomerans*. Cette activité est beaucoup plus importante en réponse aux deux *P. agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 (Figures 7 D, E), quel que soit le mode d'application de celle-ci. Pour *P. agglomerans* PTA-AF2, l'application au sol semble être la plus efficace.

De façon similaire, l'activité β -1,3-glucanase est stimulée en réponse à *P. fluorescens* PTA-268 quel que soit son mode d'application (Figure 7 F). La seconde *P. fluorescens* PTA-CT2 ne stimule l'activité β -1,3-glucanase que dans le cas où la bactérie est appliquée par infiltration (Figure 7 G).

Ce sont *B. subtilis* PTA-271 et *P. agglomerans* PTA-AF2 qui se révèlent plus efficaces en terme de stimulation de l'activité β -1,3-glucanase. Cette activité est beaucoup plus importante lorsque les bactéries sont appliquées par infiltration ou au niveau du sol.

2.2.2 Evaluation de l'activité systémique des bactéries vis-à-vis des réactions de défense de la vigne

Les bactéries sélectionnées ont été appliquées au niveau du sol afin d'évaluer leur effet systémique sur les réactions de défense de la vigne. L'activité chitinase et β -1,3-glucanase ont été déterminées dans les feuilles et dans les baies au cours de deux campagnes successives en 2003 et en 2004.

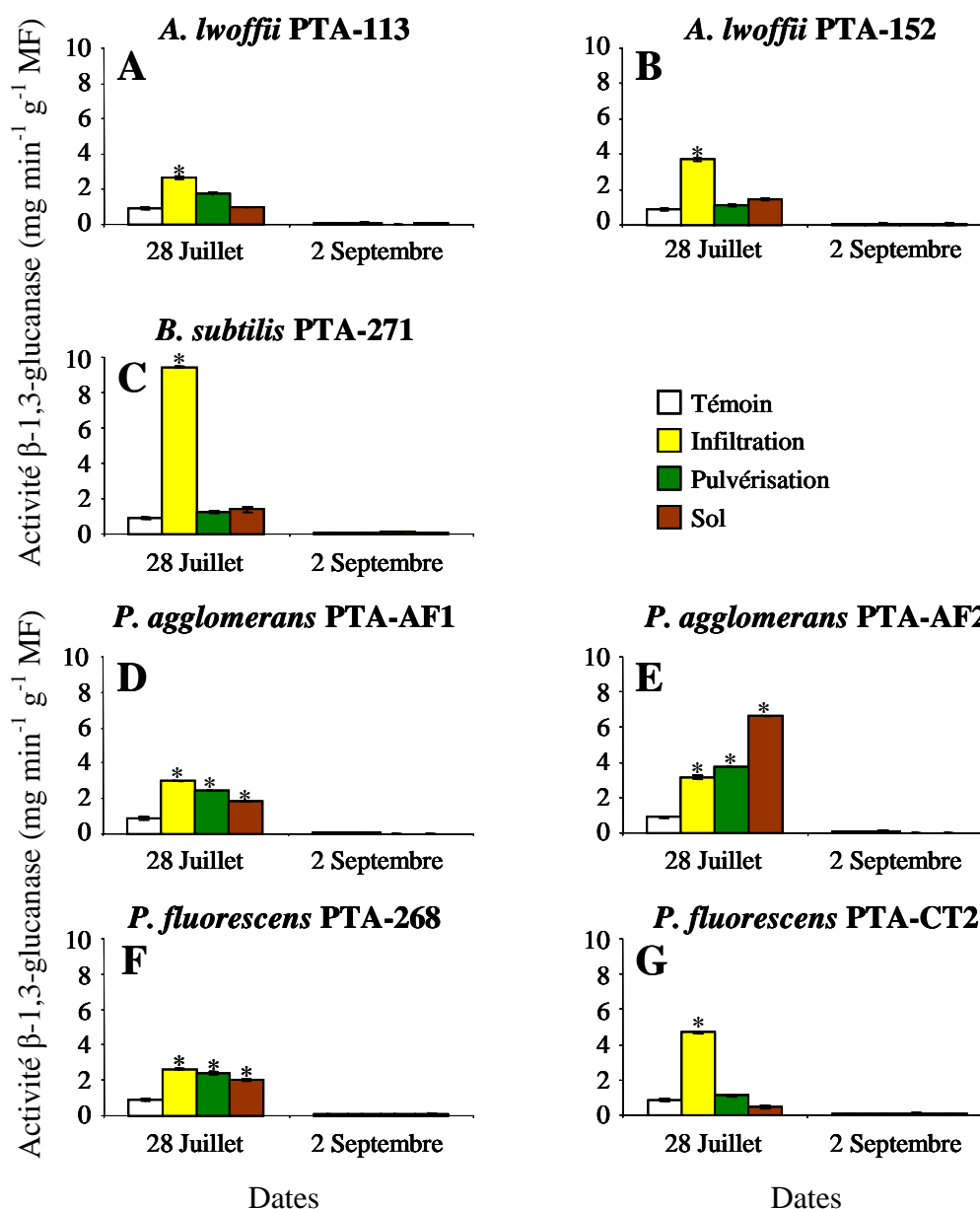


Figure 7 : Activité β -1,3-glucanase dans les baies de vigne suite à l'application des bactéries par infiltration, pulvérisation et au sol au vignoble. Les mesures ont été réalisées en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113 (A), *A. lwoffii* PTA-152 (B), *B. subtilis* PTA-271 (C), *P. agglomerans* PTA-AF1 (D), *P. agglomerans* PTA-AF2 (E), *P. fluorescens* PTA-268 (F) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (G) ont été appliquées sur la parcelle CR à une concentration de 10^8 UFC ml^{-1} par infiltration, pulvérisation ou par dépôt au sol le 25 mai 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

a. Activité chitinase, β -1,3-glucanase et phénylalanine ammonia lyase dans les feuilles

Activité chitinase

En 2003, l'activité chitinase des feuilles de vigne a été déterminée au stade de la "fermeture de la grappe" (soit deux mois après l'application des bactéries). Parmi les différentes souches testées, les deux *P. fluorescens* (PTA-268 et PTA-CT2) sont les seules capables de stimuler cette activité à des niveaux d'environ 3 fois supérieurs au témoin (Tableau III).

En 2004, l'activité chitinase est déterminée à différents stades de développement de la vigne. Chez les plantes non traitées, l'activité chitinase augmente dans les feuilles au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet). Cette activité est maintenue jusqu'au début de la véraison, puis diminue progressivement jusqu'à atteindre son niveau de base en septembre (Figure 8). Une tendance similaire a également été observée en présence des différentes souches bactériennes à différents stades de développement de la vigne, mais avec des amplitudes qui varient en fonction de la nature de la souche. L'activité chitinase est fortement stimulée au stade "fermeture de la grappe" dans les feuilles des plantes dont le sol a été enrichi en particulier par *A. lwoffii* PTA-113, *B. subtilis* PTA-271, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figures 8 A et B). Les autres bactéries (*A. lwoffii* PTA-152, *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. agglomerans* PTA-AF2) ne semblent pas exercer un effet sur l'activité chitinase dans les feuilles au cours du développement de la vigne.

Tableau III : Activité chitinase dans les feuilles de vigne suite à l'application des bactéries au vignoble en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 10 juin 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. Les valeurs suivies d'un astérisque sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Souches bactériennes	Activité chitinase ($\text{mg min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) 28/07/2003
Témoin	$0,46 \pm 0,26$
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	$0,68 \pm 0,16$
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	$0,28 \pm 0,07$
<i>B. subtilis</i> PTA-271	$0,70 \pm 0,40$
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	$0,60 \pm 0,31$
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	$0,72 \pm 0,38$
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	$1,19 \pm 0,19$ *
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	$1,26 \pm 0,32$ *

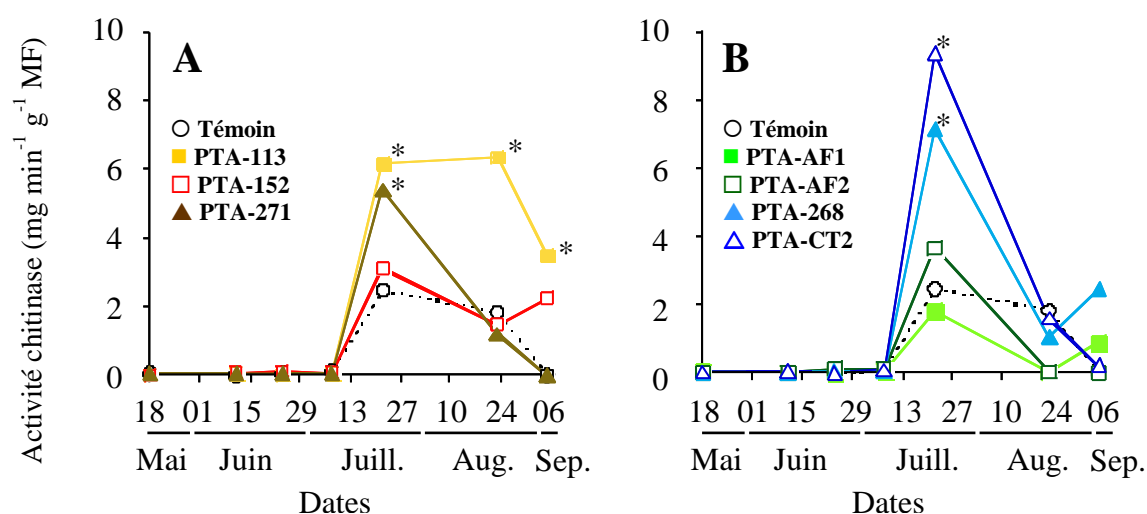


Figure 8 : Activité chitinase dans les feuilles de vigne suite à l'application de bactéries au vignoble en 2004. Les bactéries (A) *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, (B) *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 20 mai 2004. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$). L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Activité β -1,3-glucanase

L'activité β -1,3-glucanase a également été mesurée en 2003 au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet). Cette activité semble être plus importante dans les feuilles des plantes traitées avec les *P. agglomerans* et les *P. fluorescens* (Tableau IV). Une forte activité β -1,3-glucanase est obtenue en présence de *P. fluorescens* PTA-CT2.

Une cinétique concernant l'évolution de l'activité β -1,3-glucanase a été effectuée en 2004. Les résultats montrent que le profil d'évolution de l'activité β -1,3-glucanase est différent de celui de l'activité chitinase dans les feuilles. En effet, l'activité β -1,3-glucanase augmente à la fois chez le témoin et chez les plantes traitées avec un pic d'activité au stade "fermeture de la grappe" suivie d'une forte augmentation à la fin de la véraison (ou au début de la maturation) (Figure 9). A ce stade, une forte stimulation de l'activité de cette protéine PR est observée dans les feuilles des plants inoculés avec les deux *A. lwoffii* (PTA-113 et PTA-152), *B. subtilis* PTA-271 (Figure 9 A), *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 9 B). Les souches les moins actives en terme de stimulation de l'activité β -1,3-glucanase sont *P. agglomerans* PTA-AF2 et *P. fluorescens* PTA-268 (Figure 9 B).

Il ressort donc que parmi les souches étudiées, *A. lwoffii* PTA-113, *B. subtilis* PTA-271 et *P. fluorescens* PTA-CT2 sont les plus efficaces en terme de stimulation des activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles lorsqu'elles sont appliquées au sol.

Activité de la phénylalanine ammonia lyase (PAL)

Suite à l'application des bactéries au sol en 2003, les feuilles des plants de vignes traitées expriment une activité PAL dont le niveau dépend de la souche bactérienne (Figure 10). En effet les souches les plus actives sont représentées par *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152 et *B. subtilis* PTA-271 (Figure 10 A), en réponse à ces souches l'activité PAL augmente depuis la "fermeture de la grappe" (fin juillet) jusqu'au début de la véraison (mi-août). Une stimulation significative de la PAL a également été observée au stade "grains grosseur de la grenaille" (début juillet) en réponse à *P. agglomerans* PTA-AF1 (Figure 10 B). Les autres souches ne stimulent pas cette activité par rapport au témoin, quel que soit le stade de développement de la vigne (26 juin au 14 août).

Tableau IV : Activité β -1,3-glucanase dans les feuilles de vigne suite à l'application des bactéries au vignoble en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* : PTA-271, *P. agglomerans* : PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* : PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 10 juin 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. Les valeurs suivies d'un astérisque sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Souches bactériennes	Activité β -1,3-glucanase ($\text{mg min}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF) 28/07/2003
Témoin	$0,64 \pm 0,02$
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	$0,61 \pm 0,01$
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	$0,59 \pm 0,06$
<i>B. subtilis</i> PTA-271	$0,78 \pm 0,07$
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	$1,08 \pm 0,11$ *
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	$1,12 \pm 0,13$ *
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	$0,96 \pm 0,05$ *
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	$1,25 \pm 0,01$ *

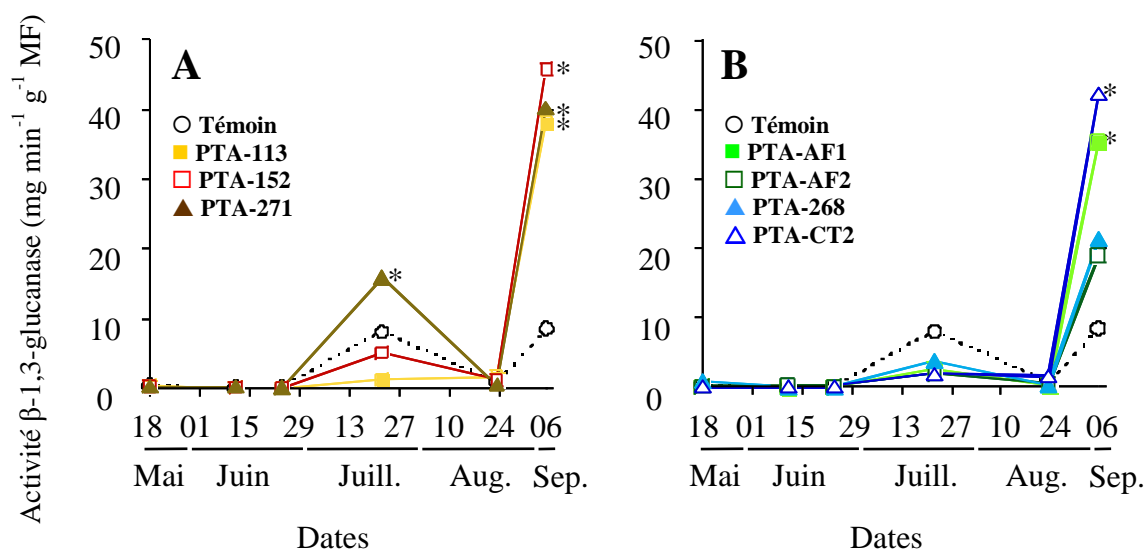


Figure 9 : Activité β -1,3-glucanase dans les feuilles de vigne suite à l'application de bactéries au vignoble en 2004. Les bactéries (A) *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, (B) *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 20 mai 2004. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$). L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

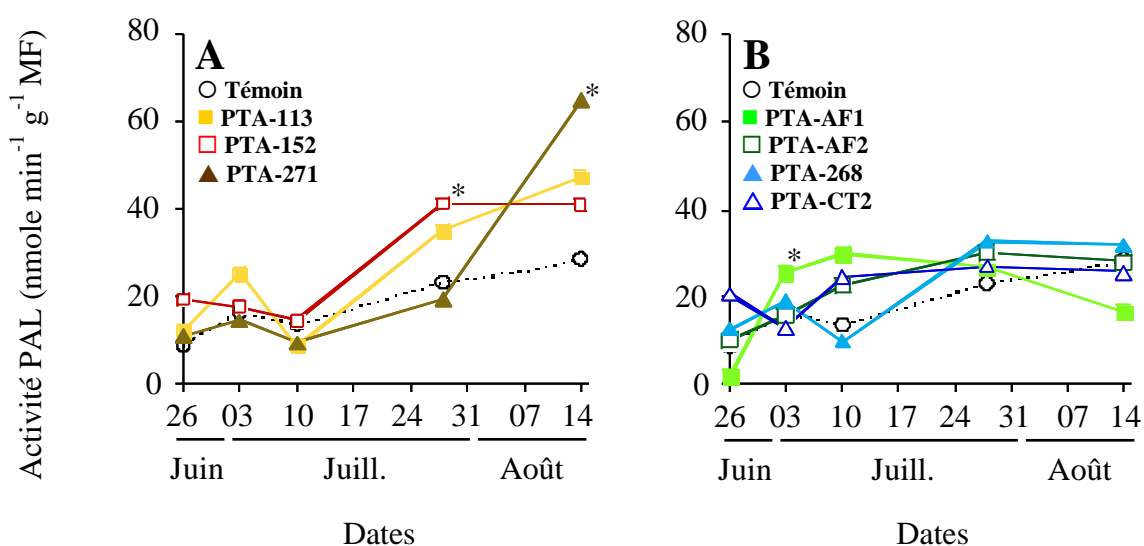


Figure 10: Activité phénylalanine ammonia lyase (PAL) dans les feuilles de vigne suite à l'application de bactéries au vignoble en 2003. Les bactéries (**A**) *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, (**B**) *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 10 juin 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$). L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

b. Activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les baies

Un suivi des activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les baies a été réalisé à différents stades de développement de la vigne en 2003 et en 2004 suite à l'application des bactéries au sol.

Activité chitinase

En 2003, l'activité chitinase a été déterminée au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet) et à la fin de la véraison (début septembre). Au stade "fermeture de la grappe", l'activité chitinase est très faible, quel que soit le traitement (Tableau V). Néanmoins une légère augmentation de cette activité est perceptible chez les feuilles des plantes traitées avec *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 (Tableau V). A la fin de la véraison, l'apport au sol des deux *A. lwoffii* (PTA-113 et PTA-152) de *B. subtilis* et des deux *P. fluorescens* (PTA-268 et PTA-CT2) se traduit par une augmentation sensible du niveau d'activité chitinase. Cette augmentation est plus marquée (d'un facteur de 15 par rapport au témoin) chez les baies des vignes inoculées avec *P. agglomerans* PTA-AF1 (Tableau V).

Les mesures réalisées au cours des différents stades de développement de la vigne en 2004 montrent que l'activité chitinase augmente progressivement depuis la véraison jusqu'à la fin de la maturation (mi-octobre). Cette tendance est observée à la fois chez le témoin et chez les plantes traitées avec les bactéries (Figure 11). Cependant, l'application des bactéries se traduit par une forte stimulation de l'activité chitinase, en particulier au moment de la maturation des baies (Figures 11 A et B). A l'exception de *P. agglomerans* PTA-AF2 (Figure 11 B), les autres souches s'avèrent capables de stimuler une activité chitinase dans les baies (Figures 11 A et B).

Tableau V : Activité chitinase dans les baies de vigne suite à l'application des bactéries au vignoble en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 10 juin 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. Les valeurs suivies d'un astérisque sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Souches bactériennes	Activité chitinase ($\text{mg min}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF)	
	28/07/2003	02/09/2003
Témoin	$0,005 \pm 0,003$	$0,38 \pm 0,04$
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	$0,012 \pm 0,003$	$1,19 \pm 0,13$ *
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	$0,024 \pm 0,006$	$1,42 \pm 0,20$ *
<i>B. subtilis</i> PTA-271	$0,069 \pm 0,007$ *	$1,27 \pm 0,21$ *
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	$0,049 \pm 0,002$ *	$5,94 \pm 0,55$ *
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	$0,018 \pm 0,007$	$0,76 \pm 0,17$
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	$0,040 \pm 0,010$ *	$1,04 \pm 0,18$ *
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	$0,043 \pm 0,011$ *	$0,90 \pm 0,13$ *

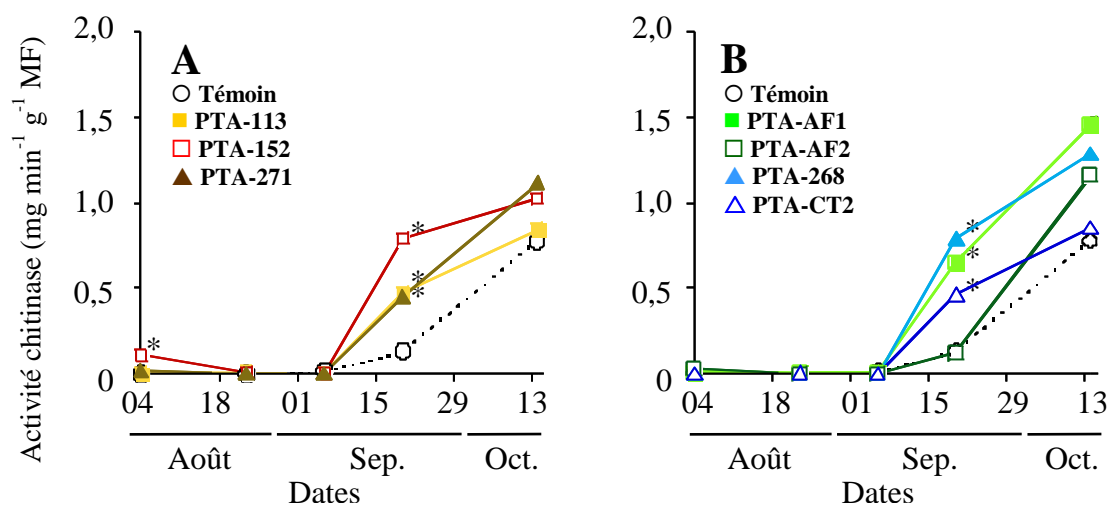


Figure 11 : Activité chitinase dans les baies de vigne suite à l'application de bactéries au vignoble en 2004. Les bactéries (A) *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, (B) *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 20 mai 2004. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$). L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Activité β -1,3-glucanase

L'analyse enzymatique chez les plants témoins en 2003 montre qu'à l'inverse de l'activité chitinase, celle de la β -1,3-glucanase est très importante au stade "fermeture de la grappe", mais faible à la fin de la véraison (Tableau VI). L'application des bactéries se traduit en général par une stimulation significative de l'activité β -1,3-glucanase dans les baies en particulier en présence d'*A. lwoffii* PTA-152, *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. fluorescens* PTA-268 (Tableau VI). Aucun effet significatif n'a été observé en présence des autres souches. Le faible niveau d'activité β -1,3-glucanase à la fin de la véraison ne permet pas de déceler un effet important des bactéries. Néanmoins, on peut noter une légère augmentation de l'activité β -1,3-glucanase en réponse à *P. fluorescens* PTA-CT2.

Les mesures de l'activité β -1,3-glucanase au cours des différents stades du développement de la vigne en 2004 montrent que les baies témoins présentent une activité β -1,3-glucanase stable depuis le stade "fermeture de la grappe" jusqu'à la fin de la véraison (soit environ 1,2 unités). L'activité β -1,3-glucanase diminue ensuite au cours de la maturation (Figure 12). L'application des bactéries au sol se traduit par une augmentation de l'activité β -1,3-glucanase, en particulier au cours des stades qui précèdent la maturation (Figure 12 A et B). Une plus forte activité β -1,3-glucanase est observée chez les vignes traitées avec *A. lwoffii* PTA-113, *B. subtilis* PTA-271 (Figure 12 A) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 12 B), (Figure 12 A).

Ce sont les deux *A. lwoffii* (PTA-113 et PT-152), *B. subtilis* PTA-271 et *P. fluorescens* PTA-CT2 qui se révèlent les plus efficaces en terme de stimulation des activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les baies. Les niveaux d'activité des deux protéines PR sont relativement comparables pour les deux années consécutives (2003 et 2004).

Dans les baies, l'évolution de l'activité chitinase est inverse à celle de l'activité β -1,3-glucanase au cours du développement de la plante. Les bactéries sont donc capables de stimuler les activités chitinase et β -1,3-glucanase chez les feuilles et les baies des plants traités. Il ressort donc que parmi les souches étudiées, *A. lwoffii* PTA-113, *B. subtilis* PTA-271 et *P. fluorescens* PTA-CT2 sont plus efficaces en terme de stimulation des activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles, alors que dans les baies ce sont les deux *A. lwoffii* (PTA-113 et PTA-152), *B. subtilis* PTA-271 et *P. fluorescens* PTA-CT2 qui sont les plus actives.

Tableau VI : Activité β -1,3-glucanase dans les baies de vigne suite à l'application des bactéries au vignoble en 2003. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* : PTA-271, *P. agglomerans* : PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* : PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 10 juin 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. Les valeurs suivies d'un astérisque sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Souches bactériennes	Activité β -1,3-glucanase ($\text{mg min}^{-1} \text{g}^{-1}$ MF)	
	28/07/2003	02/09/2003
Témoin	$4,60 \pm 0,20$	$0,17 \pm 0,01$
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	$5,38 \pm 2,10$	$0,15 \pm 0,03$
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	$10,18 \pm 0,80$ *	$0,11 \pm 0,06$
<i>B. subtilis</i> PTA-271	$3,29 \pm 0,51$	$0,14 \pm 0,01$
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	$14,42 \pm 1,87$ *	$0,14 \pm 0,02$
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	$4,63 \pm 0,63$	$0,17 \pm 0,03$
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	$14,39 \pm 0,88$ *	$0,15 \pm 0,01$
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	$6,25 \pm 1,41$	$0,39 \pm 0,07$ *

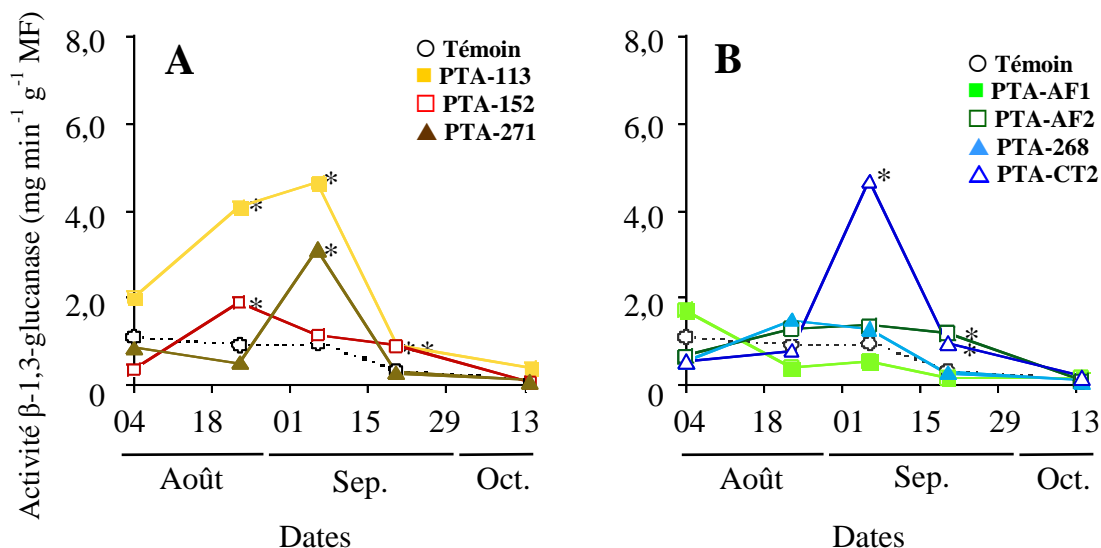


Figure 12 : Activité β -1,3-glucanase dans les baies de vigne suite à l'application de bactéries au vignoble en 2004. Les bactéries (A) *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, (B) *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268 et *P. fluorescens* PTA-CT2 ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 20 mai 2004. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$). L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

2.2.3 Relation entre la résistance de la vigne contre *B. cinerea* et les activités chitinase et β -1,3-glucanase

Nous avons montré qu'au cours du traitement de la vigne à l'aide des bactéries, les feuilles expriment une activité chitinase précoce suivie d'une forte activité β -1,3-glucanase. Dans les baies, ces activités présentent des profils inverses. Ces réactions successives sont associées à une diminution de l'infection des feuilles et des baies par *B. cinerea*. Une corrélation positive entre l'activité chitinase dans les feuilles et leur capacité à résister aux attaques de *B. cinerea* est établie (Figure 13 A). En effet, au stade fermeture de la grappe (fin juillet), les souches les plus performantes en terme d'activation de chitinase sont aussi capables d'induire une protection des feuilles contre *B. cinerea*. Il s'agit d'*A. lwoffii* PTA-113 et des *P. fluorescens* (PTA-268 et PTA-CT2) (Figure 13 A). A l'inverse, celles conduisant à une faible activité enzymatique (*A. lwoffii* PTA-152 et les *P. agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2) ne procurent qu'une faible protection des tissus foliaires contre *B. cinerea* (Figure I.13 A). Les essais réalisés sur les feuilles à la fermeture de la grappe (fin juillet) ne montrent pas de corrélation entre l'activité β -1,3-glucanase et la protection des feuilles de vigne contre *B. cinerea*, compte tenu du faible niveau de l'activité β -1,3-glucanase à ce stade (Figure 13 B).

Les mesures réalisées dans les baies montrent une faible corrélation entre les réactions de défense étudiées et la protection acquise (données non montrées). Ces résultats suggèrent que la protection induite est sous le contrôle au moins partiel de la succession de différentes réactions de défense dans les différents organes de la plante.

3 Discussion

Dans cette étude, 7 souches bactériennes, isolées de la rhizosphère et des différents niveaux d'organisation de la vigne ont été retenues pour évaluer leur capacité à protéger la vigne contre *B. cinerea*. Ces souches ont été identifiées comme *A. lwoffii* (PTA-113 et PTA-152), *B. subtilis* (PTA-271), *P. agglomerans* (PTA-AF1 et PTA-AF2) et *P. fluorescens* (PTA-268 et PTA-CT2) (Trotel-Aziz *et al.*, 2007). Dans cette étude, les effets de ces bactéries ont été appréhendés dans des conditions du vignoble *via* leur action protectrice contre *B. cinerea* et le suivi des réactions de défense de la vigne.

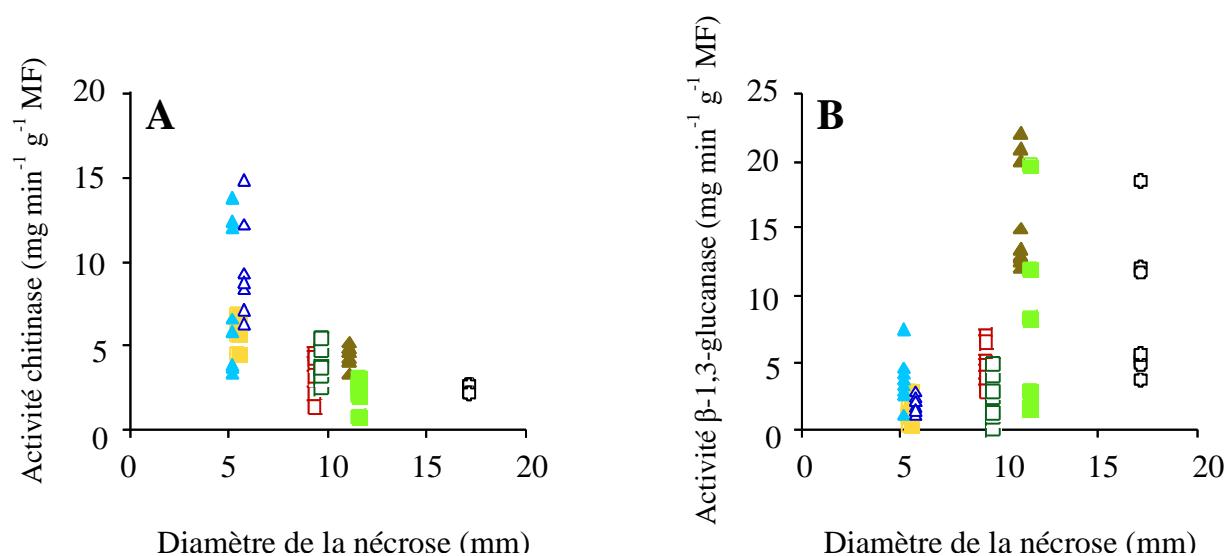


Figure 13 : Relation entre le développement de la nécrose de *B. cinerea* et les activités chitinase (**A**) et β -1,3-glucanase (**B**) dans les feuilles de vigne en réponse à l'application des bactéries. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113 (■), *A. lwoffii* PTA-152 (□), *B. subtilis* PTA-271 (▲), *P. agglomerans* PTA-AF1 (■), *P. agglomerans* PTA-AF2 (□), *P. fluorescens* PTA-268 (▲) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (△) ont été appliquées à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} au niveau du sol (parcelle NL) le 20 mai 2004. Les tests de protection des feuilles sont réalisés le 17 juillet 2004 et les mesures des activités enzymatiques le 22 juillet 2004 au stade fermeture de la grappe. Témoin : ○.

Dans une première étude, les bactéries ont été appliquées en souche pure selon trois modalités afin de rendre compte de la méthode la plus efficace pour lutter contre *B. cinerea* au vignoble. Les tests de protection réalisés sur feuilles ont montré que la réduction de la taille de la nécrose causée par *B. cinerea* est dépendante de la souche appliquée. En 2004, les apports de *P. agglomerans* PTA-AF1 (originaire des feuilles) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (originaire des sarments) réduisent fortement la taille de la nécrose, quel que soit leur mode d'application. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en 2002, montrant également une certaine variabilité de protection en réponse aux différentes souches (Magnin-Robert *et al.*, 2007). Dans la majorité des cas, le niveau de protection semble être également influencé par la méthode d'inoculation de la bactérie. En effet, l'apport des bactéries au sol se montre plus efficace par rapport à l'infiltration et à la pulvérisation de celles-ci. L'application au sol d'*A. lwoffii* PTA-113 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 se traduit par une réduction significative des attaques de *B. cinerea* dans les deux parcelles viticoles.

Par ailleurs, les différents tests réalisés en 2004 et en 2005 montrent que la protection induite par les bactéries est également variable d'une année sur l'autre. Cette variabilité pourrait relever de différents facteurs biotiques (pression parasitaire, interactions avec la microflore locale...) et abiotiques (température, disponibilité en nutriments...), mais aussi de la dose (Pillay et Nowak 1997), de la fréquence et de la méthode d'application des bactéries (Mazzola *et al.*, 1995b ; Strigul et Kravchenko, 2006). Certains de ces facteurs peuvent affecter la distribution des agents de lutte biologique au sein de la plante ou dans leur environnement (Mazzola *et al.*, 1995b) et par conséquent leur action protectrice contre *B. cinerea*. Cette hypothèse corrobore l'idée selon laquelle les bactéries endophytes (originaires de feuilles et de sarments) appartenant aux genres *Pantoea* et *Pseudomonas* seraient plus efficaces contre *B. cinerea* que celles originaires de la rhizosphère. Chez le coton ou chez la pomme de terre, il a été montré que des souches bactériennes endophytes appartenant aux genres *Aureobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Clavibacter* sp., *Methylbacterium* sp., *Paenibacillus* sp., *Phyllobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., sont capables de lutter efficacement contre des pathogènes fongiques et même bactériens (Chen *et al.*, 1995 ; Sessitsch *et al.*, 2004).

L'application au sol des bactéries issues du vignoble se traduit par une réduction de la nécrose foliaire et du pourcentage de contamination des baies dans les conditions du vignoble. Les bactéries les plus efficaces en terme de protection des feuilles contre *B. cinerea* sont

représentées par *A. lwoffii* PTA-113 et PTA-152, *P. fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2 et *P. agglomerans* PTA-AF1. On note toutefois une certaine hétérogénéité quant à la protection des baies par ces souches. Une protection significative des baies a été observée avec *P. agglomerans* PTA-AF1 en particulier chez les grappes situées sur la face Est des rangs faiblement infectée par *B. cinerea*. Ceci peut être expliqué par une différence de microclimat présent dans la canopée pouvant influencer le développement et /ou la virulence du champignon (Nair et Allen, 1993 ; Percival *et al.*, 1994 ; Holz *et al.*, 2003 ; Schmidt *et al.*, 2004), mais aussi l'activité et/ ou la croissance des agents de biocontrôle (Davies et Whitbread, 1989 ; Mathre *et al.*, 1994 ; Hannusch et Boland, 1996 ; Bai *et al.*, 2002).

Des études antérieures ont montré que la protection induite par certaines bactéries serait liée à leur capacité à coloniser le sol, la rhizosphère et les tissus de la plante (Bull *et al.*, 1991 ; Chin-A-Woeng *et al.*, 2000 ; Giddens *et al.*, 2003 ; Schmidt *et al.*, 2004). D'autres travaux démontrent que *P. agglomerans* est une bactérie rhizosphérique ou épiphytisque efficace aussi bien chez le poirier contre *Erwinia amylovora* (Stockwell *et al.*, 2002 ; Wright *et al.*, 2001) que chez des fruits (pomme, cerise, fraise) stockés après la récolte contre *B. cinerea*, *Penicillium expansum* ou *Rhizopus stolonifer* (Francès *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont également été rapportés suite à l'utilisation de *P. fluorescens* et de *B. subtilis* chez de nombreuses plantes (abricotier, chou, concombre, haricot, tomate) vis-à-vis d'agents pathogènes fongiques ou même viraux (Van Peer *et al.*, 1991 ; Asaka et Shoda., 1996 ; Leeman *et al.*, 1996 ; Georgakopoulos *et al.*, 2002 ; Walker *et al.*, 2002 ; Altindag *et al.*, 2006 ; Ji *et al.*, 2006). Nos résultats démontrent aussi pour la première fois que deux souches de type *Acinetobacter lwoffii* (d'origine racinaire) sont capables de protéger la vigne contre *B. cinerea* au vignoble.

Les niveaux de protection des feuilles obtenus en 2005 (en l'absence de renouvellement d'application des bactéries) sont généralement comparables voire améliorés par rapport à ceux obtenus en 2004. L'effet protecteur contre *B. cinerea* est nettement marqué en présence de *P. agglomerans* PTA-AF1 et des deux *P. fluorescens* chez les feuilles et en présence des deux *A. lwoffii* et des deux *P. agglomerans* chez les baies. Ces effets bénéfiques peuvent être liés à l'origine et/ou la source des bactéries sélectionnées et donc à leur adaptation à l'environnement viticole. Cette adaptation pourrait contribuer au maintien des bactéries à un niveau suffisant dans la rhizosphère ou dans les tissus de la plante au cours de son développement. Les travaux de Yan *et al.* (2003) montrent que les populations de *P. fluorescens* possèdent une capacité à coloniser les racines de tomate supérieure à celle des

populations de *Bacillus pumilus*. Néanmoins, *B. pumilus* est plus persistante dans la rhizosphère compte tenu de la formation d'endospores contribuant à son adaptation et sa survie aux conditions du milieu (Yan *et al.*, 2003).

La pression parasitaire semble aussi affecter l'activité protectrice des bactéries issues du vignoble. Ainsi, en 2004 le taux de contamination des baies était voisin de 45% et la meilleure protection obtenue en présence des bactéries ne dépasse pas 24%, alors qu'en 2005 la pression parasitaire était faible (13,5%) et la protection des baies atteint environ 63%. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant que le contrôle de certains champignons pathogènes par des bactéries est moins efficace en présence d'une forte pression parasitaire (Landa *et al.*, 2001 ; Schmidt *et al.*, 2004).

La protection induite par les bactéries semble résulter de processus liés à une résistance systémique induite (ISR) chez la vigne, compte tenu de la séparation spatiale des sites d'application des bactéries (sol) et de l'agent pathogène (feuilles et baies). Le degré de cette ISR est différent d'une souche à l'autre et pourrait relever de divers mécanismes impliquant l'origine des bactéries et /ou leur concentration dans la rhizosphère ou dans les tissus de la plante, mais aussi de la nature des composés d'origine bactérienne pouvant contribuer à l'ISR (Raaijmakers *et al.*, 1995 ; Han *et al.*, 2006). L'hypothèse d'une ISR induite par les *Pseudomonas* contre différents pathogènes a largement été rapportée chez *Arabidopsis thaliana*, le radis, le tabac ou encore l'œillet (Van Peer *et al.*, 1991 ; Maurhöfer *et al.*, 1994 ; Leeman *et al.*, 1995 ; Pieterse *et al.*, 1996 ; Iavicoli *et al.*, 2003).

La résistance induite par les bactéries chez la vigne se trouve souvent liée à une stimulation des réactions de défense, en particulier de l'activité chitinase et dans certains cas à celle de la β -1,3-glucanase dans les feuilles et dans les baies. Dans tous les cas, ces deux réactions sont stimulées de manière successive et semble être alternées au cours du développement de la vigne. En effet, lorsque l'activité chitinase chute dans les feuilles (à la fin de la véraison), celle des baies augmente au cours de la maturation des fruits. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs (Robinson *et al.*, 1997 ; Salzman *et al.*, 1998). A l'inverse, lorsque l'activité de β -1,3-glucanase augmente dans les feuilles à la fin de la véraison, celle des baies chute en pleine maturation des fruits. Ces résultats sont différents de ceux décrits par Robinson *et al.* (1997) et par Derckel *et al.* (1998b), qui ne détectent aucune activité β -1,3-glucanase dans les baies quel que soit leur stade de développement.

L'amplitude des activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles et dans les baies est différente d'une souche à une autre, malgré des profils comparables à ceux du témoin.

Globalement une forte activité chitinase est exprimée dans les feuilles au stade "fermeture de la grappe" et dans les baies au cours de la maturation en réponse aux deux *P. fluorescens* et *A. lwoffii* PTA-113, alors que la β -1,3-glucanase est fortement activée par les deux souches d'*A. lwoffii*, *P. fluorescens* PTA-CT2 et *P. agglomerans* PTA-AF1 dans les feuilles à la fin de la véraison et dans les baies dès la mi-véraison. Ces résultats suggèrent que la stimulation des activités chitinase et β -1,3-glucanase pourrait résulter de l'activation de différentes isoformes de ces protéines PR présentes dans les feuilles et/ou dans les baies. D'autre part, la succession temporelle et spatiale des activités de ces protéines suggère qu'il y aurait un transfert de signaux d'un organe à un autre dès le début de la véraison, régissant l'expression des protéines de défenses ou encore le transport des protéines PR d'un organe à l'autre. En ce sens, les travaux de Bortolotti *et al.* (2005), réalisés sur des plants de tabacs transgéniques surexprimant une protéine PR originaire du maïs, suggèrent que cette protéine serait transportée des racines vers les feuilles via les plasmodesmes des éléments du phloème.

L'accumulation ou l'expression des chitinases et β -1,3-glucanases a été mise en évidence chez la vigne en réponse à de nombreux pathogènes tels que *Pseudomonas syringae*, *P. viticola* (Busam *et al.*, 1997 ; Robert *et al.*, 2002), *B. cinerea* (Derckel *et al.*, 1999 ; Robert *et al.*, 2002) et *E. necator* (Robert *et al.*, 2002). Des réactions similaires ont également été observées suite à l'application de composés activateurs de la SAR (Busam *et al.*, 1997 ; Derckel *et al.*, 1998b ; Repka *et al.*, 2000), d'oligosaccharides (Repka *et al.*, 2000 ; Aziz *et al.*, 2003 ; 2004 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2006 ; Aziz *et al.*, 2006 ; 2007) ou à l'exposition aux UV (Bonomelli *et al.*, 2004). L'implication de ces protéines PR dans la résistance de la vigne contre les agents pathogènes a été fortement suggérée en utilisant deux souches de *B. cinerea* de différents degrés de virulence (Derckel *et al.*, 1999) ou des cépages de sensibilités différentes (Busam *et al.*, 1997 ; Giannakis *et al.*, 1998 ; Aziz *et al.*, 2003 ; 2004 ; Bonomelli *et al.*, 2004). Des effets synergiques de ces protéines PR ont aussi été suggérés (Mauch *et al.*, 1988 ; Jach *et al.*, 1995). En outre, les chitinases et les β -1,3-glucanases génèrent des oligomères de glucane ou de chitine à partir de la paroi des pathogènes, susceptibles d'être reconnus par des récepteurs membranaires de la plante et d'amplifier les réactions de défense (Punja et Zhang, 1993 ; Fritig *et al.*, 1998).

L'existence d'une corrélation entre l'activité chitinase et la protection des feuilles contre *B. cinerea* suggère que cette réaction de défense serait impliquée dans l'établissement d'une ISR. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Cartieaux *et al.* (2003) ou par Wang *et al.* (2005) chez *A. thaliana* et contraires aux travaux de Pieterse et de ses collaborateurs

(2001) ne montrant aucune relation entre l'ISR et l'induction des protéines PR en réponse aux rhizobactéries chez la même plante (*A. thaliana*). Toutefois, l'absence de corrélation entre l'activité β -1,3-glucanase et la résistance des feuilles à *B. cinerea* peut être liée au stade de développement mais aussi aux mécanismes impliqués dans la régulation des β -1,3-glucanases. Ces résultats suggèrent que l'expression de la résistance impliquerait d'autres mécanismes de défense opérant au niveau des voies des phénylpropanoïdes ou celles des dérivées des acides gras. Dans ce sens, des études sur des feuilles de vitoplants ont montré que certaines de ces bactéries sont capables de stimuler l'activité de la LOX et celle de la PAL (Trotel-Aziz *et al.*, 2007) ainsi que l'accumulation des phytoalexines, resvératrol et viniférines (Verhagen *et al.*, communication personnelle). En outre, nous avons montré que l'application des bactéries au vignoble conduit aussi à une stimulation transitoire de l'activité PAL chez les feuilles de vigne. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse des phytoalexines et de SA. Ces composés pourraient donc intervenir dans la résistance des feuilles contre *B. cinerea* suite à l'application des bactéries au vignoble.

Dans cette étude, même si l'effet direct des bactéries sur l'agent pathogène n'a pas été rapporté, des résultats à partir de tests réalisés *in vitro* ont révélé que parmi les 7 souches sélectionnées, seules *P. agglomerans* (PTA-AF1) et *P. fluorescens* (PTA-CT2) exercent une activité antagoniste vis-à-vis de *B. cinerea* (Trotel-Aziz *et al.*, 2007). Les mêmes bactéries sont aussi capables d'induire de multiples réactions de défense chez la vigne. Ces résultats suggèrent que l'effet protecteur induit par ces souches peut résulter à la fois de la stimulation des mécanismes de défense de la plante et d'un effet antifongique direct (De Boer *et al.*, 2003 ; Lucy *et al.*, 2004). Dans cette étude, même si les souches sont appliquées au sol et considérées séparées de *B. cinerea*, il est probable qu'il existe des interactions directes entre les bactéries et le pathogène dans les tissus de la plante. Différentes souches de *P. fluorescens* (Maurhöfer *et al.*, 1994 ; Dowling et O'Gara, 1994 ; Iavicoli *et al.*, 2003 ; Meziane *et al.*, 2005), *P. agglomerans* (Amellal *et al.*, 1998 ; Wright *et al.*, 2001 ; Stockwell *et al.* 2002) et de *B. subtilis* (Pusey, 1989 ; Rodgers, 1989 ; Asaka et Shoda, 1996 ; Schmidt *et al.*, 2004) sont capables d'agir directement contre différents agents pathogènes en synthétisant des molécules chélatrices de fer (sidérophores) ou des composés à activités antifongiques (antibiotiques, enzymes hydrolytiques). Ces composés synthétisés par les bactéries peuvent aussi contribuer à l'induction de l'ISR (Mazzola *et al.*, 1995a ; Van Wees *et al.*, 1997 ; Audenaert *et al.*, 2002 ; Stockwell *et al.*, 2002 ; Bakker *et al.*, 2003 ; Iavicoli *et al.*, 2003 ; Meziane *et al.*, 2005). On peut noter que dans la majorité des cas la protection induite par les

bactéries contre *B. cinerea* serait d'avantage liée à l'induction de la résistance chez la vigne qu'à un effet antagoniste direct.

CHAPITRE 2

EFFETS DES COMBINAISONS DE
BACTERIES SUR LA PROTECTION
CONTRE *B. CINEREA* ET STIMULATION DES
DEFENSES DE LA VIGNE DANS LES
CONDITIONS DU VIGNOBLE

CHAPITRE 2

Effets des combinaisons de bactéries sur la protection contre *B. cinerea* et stimulation des défenses de la vigne dans les conditions du vignoble

1 Introduction

Diverses bactéries issues de la rhizosphère ou de la phyllosphère sont capables de protéger certaines plantes vis-à-vis de nombreux organismes pathogènes. Cette protection impliquerait des mécanismes d'action directs et indirects aboutissant à une résistance systémique induite (ISR) chez la plante. Les bactéries capables d'induire une ISR sont généralement rhizosphériques ou endophytiques et appartiennent aux genres *Bacillus* sp. (Benhamou *et al.*, 1996b ; Sailaja *et al.*, 1997 ; Park et Kloepper, 2000), *Burkholderia* sp. (Sharma et Nowak, 1998), *Lysobacter* sp. (Kilic-Ekici et Yuen, 2004), *Pseudomonas* sp. (Van Peer *et al.*, 1991 ; Wei *et al.*, 1991 ; M'Piga *et al.*, 1997 ; Ongena *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2000 ; Park et Kloepper, 2000 ; Iavicoli *et al.*, 2003) et *Serratia* sp. (Li *et al.* 1995 ; Press *et al.*, 1997 ; Park et Kloepper, 2000). Les mécanismes responsables des effets protecteurs sont donc multiples et variables d'une souche à l'autre. Certains d'entre eux peuvent intervenir indépendamment, mais ils coexistent souvent et peuvent interférer les uns avec les autres (Hamdan *et al.*, 1991 ; Duijff *et al.*, 1993 ; Pal *et al.*, 2001 ; Someya *et al.*, 2001 ; Bolwerk *et al.*, 2003 ; Kamensky *et al.*, 2003).

L'efficacité de la lutte biologique *via* l'utilisation d'une seule bactérie est souvent variable et dépend du pathosystème et des conditions d'expérimentation (Handelsman et Stabb, 1996 ; Lucy *et al.*, 2004). Cette variabilité résulterait, d'une part des capacités adaptatives de l'agent de la lutte biologique aux facteurs de l'environnement (température, activité de l'eau, caractéristiques du sol, disponibilité en éléments nutritifs...) (Mathre *et al.*, 1994 ; Horwath *et al.*, 1998 ; Laville *et al.*, 1999 ; Schmidt *et al.*, 2004 ; Strigul et Kravchenko, 2006) et d'autre part des interactions directes ou indirectes avec les autres microorganismes associés à la plante (Postma *et al.*, 1990 ; Wright *et al.*, 1995 ; Van Veen *et al.* 1997 ; Brimecombe *et al.*, 1999). D'autres facteurs comme la nature et l'abondance des exsudats racinaires peuvent être

impliqués dans l'efficacité de l'action des agents de lutte biologique (Kazmar *et al.*, 2000 ; Notz *et al.*, 2002 ; Kravchenko *et al.*, 2003 ; Kamilova *et al.*, 2006 ; Strigul et Kravenchko, 2006). Ces facteurs de nature biotique et abiotique sont susceptibles d'affecter la croissance et la survie des agents de la lutte biologique et par conséquent de moduler leur activité de colonisation (Weller, 1988 ; Davies et Whitbread, 1989 ; Pillay et Nowak, 1997) et de biocontrôle (Schippers *et al.*, 1987; Hannusch et Boland, 1996). Certains travaux illustrent l'implication de facteurs de l'environnement dans la régulation de la production par les bactéries de divers composés déterminants dans la lutte biologique contre des agents pathogènes (Laville *et al.*, 1992). Ainsi, la production d'antibiotiques, tels que le DAPG et la phénazine-1-carboxamide par des *Pseudomonas* sp. est stimulée par une disponibilité importante de glycérol, de phénylalanine ou de tyrosine (Duffy et Défago, 1999 ; Van Rij *et al.*, 2004) par les baisses de température (21 à 16°C), les stress salins et le manque de fer, de sulfate et de phosphate (Van Rij *et al.*, 2004). Duffy et Défago (1999) relatent un effet régulateur du glucose qui peut à la fois stimuler la production du DAPG et inhiber la production de pyolutéorine chez *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Maurhöfer et ses collègues (2004) ont récemment observé que l'association de deux *P. fluorescens* CHA0 et Q2-87 permettait d'augmenter la production de DAPG par chacune des bactéries. Un autre exemple d'interaction dans la rhizosphère concerne l'acide fusarique issu de *Fusarium oxysporum*, capable d'inhiber la production du DAPG chez *P. fluorescens* CHA0 et d'affaiblir donc la capacité de la bactérie à protéger les plants de tomate contre *Fusarium oxysporum* (Duffy et Défago, 1997 ; Schneider-Keel *et al.*, 2000 ; Notz *et al.*, 2002 ; Duffy *et al.*, 2004). Ce composé inhibe également la multiplication d'agents de la lutte biologique appartenant au genre *Bacillus* (Bacon *et al.*, 2006). D'autres composés issus des rhizobactéries peuvent réguler les déterminants bactériens du biocontrôle. Ainsi la N-acyl-homosérine (AHL) lactone issue de *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, stimule chez celle-ci la production de phénazine (antibiotique) (Pierson *et al.*, 1998a, b). Van den Broek *et al.* (2003) ont décrit chez une même espèce bactérienne de *Pseudomonas* sp. deux états physiologiques différents qualifiés de phase I et phase II. Les bactéries en phase I sont capables de protéger le blé contre *Gaeumannomyces graminis* pv. *tritici* via la production de composés antifongiques, des protéases, des lipases et des chitinases. A l'inverse, les bactéries en phase II ne produisent pas de molécules antifongiques et par conséquent perdent leur capacité protectrice. Ce phénomène pourrait exister chez de nombreuses bactéries et serait donc à l'origine d'une variabilité de l'efficacité de la lutte biologique.

Les taux de protection obtenus suite à l'utilisation d'un seul microorganisme de la lutte biologique sont souvent très variables selon le type de pathogènes. Ces microorganismes apportent généralement des niveaux de protection partiels, parfois inconstants et dépendant des conditions du milieu (Mathre *et al.*, 1994 ; Dik *et al.*, 1999 ; Schmidt *et al.*, 2001 ; Jetiyanon et Klopper, 2002 ; De Boer *et al.*, 2007). D'où la nécessité de combiner ou d'alterner des agents de lutte biologique possédant des mécanismes d'action complémentaires afin d'optimiser leur efficacité vis-à-vis des agents phytopathogènes (Woo *et al.*, 2002). De nombreuses études ont montré que l'application des souches bactériennes en mélanges se traduit par une forte protection contre les agents pathogènes par comparaison aux effets obtenus à l'aide d'une seule souche (Janisiewicz et Bors, 1995 ; Schisler, 1997 ; Dunne *et al.*, 1998 ; Fukui *et al.*, 1999 ; De Boer *et al.*, 1999 ; Guetsky *et al.*, 2002a ; De Boer *et al.*, 2003). Ainsi, les combinaisons de *Pseudomonas putida* RE8 avec *P. putida* WCS358 ou de *P. putida* RS56 avec *P. fluorescens* RS-111 permettent d'obtenir une réduction plus importante des attaques de *Fusarium oxysporum* sur le radis par rapport à l'application de chacune des bactéries séparément (De Boer *et al.*, 1999). Ces effets résulteraient de la combinaison de différents mécanismes d'actions caractérisant ces souches, comme il a été rapporté par d'autres auteurs chez la tomate, le pommier, l'oranger, le concombre, le maïs ou la betterave (Janisiewicz, 1996 ; Dunne *et al.*, 1998 ; Raupach et Klopper, 1998 ; Pal *et al.*, 2001 ; Whipps, 2001 ; Szczech et Shoda, 2004 ; Roberts *et al.*, 2005 ; Meziane *et al.*, 2006). Dans certains cas, la production d'antibiotiques contribuant à la suppression de phytopathogènes fongiques est augmentée chez les bactéries antagonistes en présence de diverses rhizobactéries (Pierson *et al.*, 1998 a ; 1998b ; Lutz *et al.*, 2004 ; Maurhöfer *et al.*, 2004 ; De Boer *et al.*, 2007). D'autres phénomènes liés à l'adaptation des agents de la lutte biologique et à la colonisation de la plante au cours de son développement seraient déterminants dans l'efficacité et la stabilité de la protection induite par les mélanges de bactéries (Raupach et Klopper, 1998). La combinaison de différents mécanismes d'action résultant de l'association de différents agents contribuerait à lutter contre un large spectre d'agents pathogènes.

En plus des effets coopératifs entre des agents de la lutte biologique, il n'est pas exclu que certaines bactéries puissent être antagonistes vis-à-vis d'autres organismes initialement actifs. Dans une récente étude (Anderson *et al.*, 2004), il a été montré qu'une *Pseudomonas fluorescens* A506 était capable de sécréter une protéase impliquée dans la lutte contre *Erwinia amylovora* chez le poirier et le pommier. Cette protéase serait également susceptible de dégrader des molécules antibiotiques produites par d'autres bactéries

bénéfiques, *Pantoea agglomerans* Eh252 et *P. agglomerans* C9-1, inhibant ainsi leur pouvoir protecteur. Le phénomène de compétition pour les éléments nutritifs intervient également dans l'antagonisme direct entre des agents de la lutte biologique provoquant ainsi une perte de l'activité protectrice des mélanges bactériens vis-à-vis d'un pathogène fongique (de la Cruz *et al.*, 1992 ; Raaijmakers *et al.*, 1995 ; De Boer *et al.*, 1999). Cette perte d'activité protectrice semble également dépendre de l'ordre dans lequel les souches constituant le mélange sont appliquées sur la plante (Szczzech et Shoda, 2004).

Dans le précédent chapitre, nos résultats relatifs à l'utilisation de bactéries individuelles ont permis de distinguer que le pourcentage de protection et l'amplitude des réactions induites chez la vigne variaient en fonction de la souche, du mode de son application, mais aussi de la pression parasitaire caractérisant chaque parcelle d'expérimentation. L'objectif de cette étude est d'améliorer le taux de protection de la vigne contre *B. cinerea* en associant des souches distinctes sur le plan génétique qui pourraient agir via des mécanismes complémentaires. Les souches bactériennes sélectionnées ont été appliquées au vignoble sous forme de différentes combinaisons allant de deux à sept souches. Les effets de ces mélanges ont été évalués à la fois au niveau de la protection des feuilles et des baies de vigne contre *B. cinerea* et de l'activation de certaines réactions de défense (chitinase et β -1,3-glucanase et dans certains cas la PAL).

2 Résultats

Les expériences ont été menées dans les mêmes conditions que celles relatives à l'application des bactéries individuelles au vignoble présentées dans le chapitre 1.

2.1 Evaluation de la résistance de la vigne à *B. cinerea* suite à l'application des mélanges de bactéries

L'effet systémique des mélanges de bactéries a été évalué au vignoble par des essais de protection contre *B. cinerea* à la fois chez les feuilles et chez les baies lorsque les bactéries sont appliquées au sol. Les applications des mélanges ont été réalisées en 2003 et en 2004. Une étude similaire a également été réalisée en 2005 en l'absence de renouvellement de l'application des bactéries.

2.1.1 Effet des mélanges de bactéries sur la protection des feuilles contre *B. cinerea*

a. Suite à l'application annuelle des bactéries

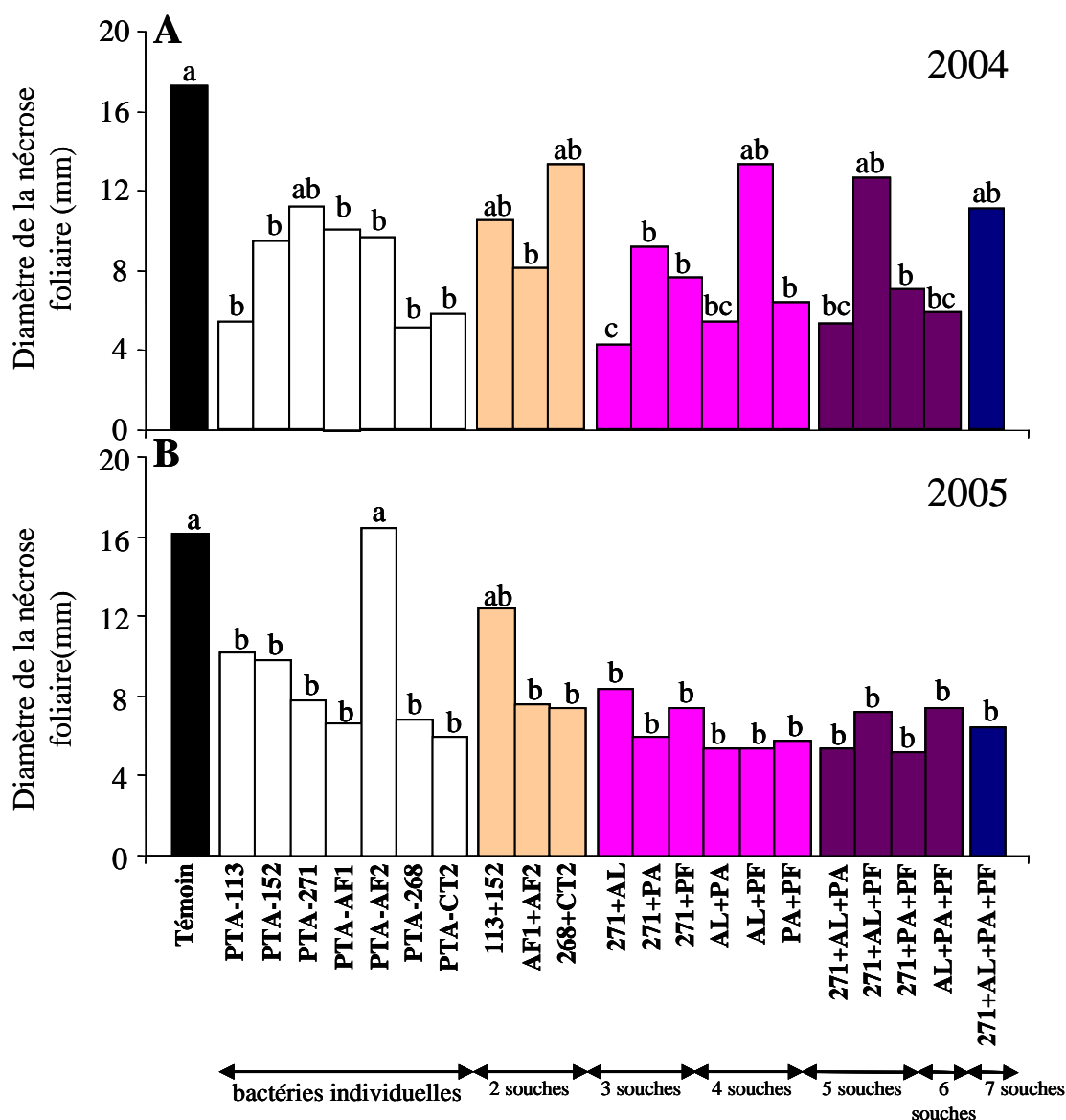
Les tests de protection ont été réalisés chez des feuilles prélevées au vignoble en 2004 puis inoculées au laboratoire par une suspension conidienne de *B. cinerea*. Les résultats obtenus montrent que les effets de plusieurs combinaisons de bactéries se traduisent par une réduction de la taille de la nécrose foliaire causée par *B. cinerea* (Figure 1 A). L'enrichissement du sol par le mélange des deux souches de *P. agglomerans* (AF1+AF2) conduit à un taux de protection d'environ 53% (Figure 1 A). *B. subtilis* à elle seule ou les deux mélanges binaires *A. lwoffii* (113+152) et *P. fluorescens* (268+CT2) ne provoquent pas d'effet protecteur significatif (Figure 1 A).

Les combinaisons de trois souches, en particulier de *B. subtilis* PTA-271 avec les deux souches d'*A. lwoffii* AL (271+AL) ou avec les deux *P. fluorescens* PF (271+PF) conduisent elles aussi à une réduction importante de la nécrose, d'environ 75% et 56% (Figure 1 A). Le mélange contenant *B. subtilis* PTA-271 et *P. agglomerans* PA (271+PA) se traduit aussi par une protection significative des feuilles pouvant atteindre 47%. Les mélanges quaternaires composés d'*A. lwoffii* AL et *P. agglomerans* PA (AL+PA) ou de *P. agglomerans* PA et *P. fluorescens* PF (PA+PF) favorisent aussi une protection significative contre *B. cinerea*, de même ordre voire supérieure à celle obtenue chez les vignes traitées avec les mélanges binaires qui les composent. Le mélange constitué d'*A. lwoffii* AL et *P. fluorescens* PF (AL+PF) ne montre pas d'effet protecteur.

A l'exception de la combinaison 271+AL+PF, l'association de 5 à 6 souches se traduit par une protection importante comprise entre 59 et 69% (Figure 1 A). Cette protection est sensiblement supérieure à celle induite par chaque genre séparément. L'apport des 7 souches en mélange (MIX 7) ne procure pas d'effet protecteur significatif, lorsque celles-ci sont appliquées au sol (Figure 1 A).

b. En l'absence de renouvellement annuel des bactéries

En 2005, les essais ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment sur des feuilles issues de plantes ayant été bactérisées en 2003 et en 2004. Dans la majorité des cas, les feuilles issues de vigne dont le sol a été enrichi préalablement par des mélanges de bactéries expriment une résistance accrue à *B. cinerea* (Figure 1 B). Le mélange des deux souches de *P. agglomerans* (AF1+AF2) conduit à une protection similaire à



Suspensions bactériennes

Figure 1 : Protection des feuilles de vigne contre *B. cinerea* par des mélanges de bactéries issues du vignoble. Les mélanges de souches ont été appliqués au sol du vignoble (NL) à une concentration finale de 10^8 UFC ml^{-1} (150 ml par plante) en 2003 et en 2004. En 2005, l'apport des bactéries au sol n'a pas été renouvelé. Les feuilles de vigne ont été prélevées le 17 juillet 2004 (deux mois après l'application des bactéries) (A) et le 21 juillet 2005 (B), puis inoculées au laboratoire avec une suspension conidienne de *B. cinerea* à 1×10^5 spores ml^{-1} . La contamination des feuilles (diamètre de la nécrose) a été estimée 7 j post-inoculation. Les valeurs représentent les moyennes des nécroses sur 20 à 30 feuilles par traitement. Les histogrammes ayant la même lettre ne sont pas significativement différents d'après le test de Duncan ($p < 0,05$). AL = 113+152, PA = AF1+AF2, PF = 268+CT2, MIX7 = 271+AL+PA+PF.

celle obtenue en 2004 (Figure 1 A et B), alors que celui constitué des deux *P. fluorescens* (268+CT2) (n'ayant pas d'effet en 2004) conduit à une forte protection des feuilles contre *B. cinerea* en 2005 (d'environ 50%). Aucune réduction significative des attaques de *B. cinerea* n'a été observée chez les plantes traitées par le couple *A. lwoffii* (113+152) (Figure 1 A et B). L'application au sol en 2003 et en 2004 des mélanges 3 et 4 souches se traduit par une protection significative des feuilles en 2005. En effet, les mélanges constitués de 271+AL, de 271+PA, de 271+PF, de AL+PA, de AL+PF ou de PA+PF conduisent à une protection pouvant atteindre 60% par rapport au témoin (Figure 1 B). Les feuilles issues de vigne précédemment traitées par les mélanges constitués de 5 (271+AL+PA, 271+AL+PF, 271+PA+PF), de 6 (AL+PA+PF) ou de 7 souches (MIX 7) expriment elles aussi une résistance accrue à *B. cinerea*, comprise entre 54 et 68 %.

Ces résultats montrent que les mélanges de bactéries ne conduisent pas nécessairement à une protection des feuilles contre *B. cinerea* supérieure à celle obtenue en réponse aux bactéries individuelles. On peut noter également que les niveaux de protection des feuilles obtenus en 2005 sont généralement supérieurs à ceux de 2004.

2.1.2 Effet des mélanges de bactéries sur la protection des baies contre *B. cinerea*

a. Suite à l'application annuelle des bactéries

Les effets protecteurs des mélanges de bactéries ont également été estimés chez les baies. En 2004, compte tenu d'une faible pression de *B. cinerea* observée à la maturation, l'estimation de la contamination a été réalisée tardivement (soit le 28 octobre 2004). Chez le témoin, une moyenne de 44,7% baies contaminées par grappe a été observée en 2004 (Figure 2 A). Cette contamination concerne environ 35% des baies chez les grappes situées sur le côté Est des rangs et 54,5% de celles situées sur le côté Ouest (Tableau I). L'apport des bactéries au sol se traduit généralement par une protection significative des baies qui varie en fonction de la composition des mélanges de souches. Le mélange de deux souches appartenant à *P. agglomerans* (AF1+AF2) conduit à une protection significative des baies contre *B. cinerea* (Figure 2 A). Cette protection est particulièrement nette sur le côté Ouest des vignes, où l'intensité des symptômes est réduite (d'environ 24%). Ce niveau de protection est d'ailleurs très proche de celui induit par *P. agglomerans* PTA-AF1 seule (Figure 2 A). Les baies des plantes traitées avec les autres mélanges binaires constitués des deux souches *A. lwoffii* (113+152) ou *P. fluorescens* (268+CT2) présentent le même degré de contamination que le témoin (Figure 2 A, Tableau I).

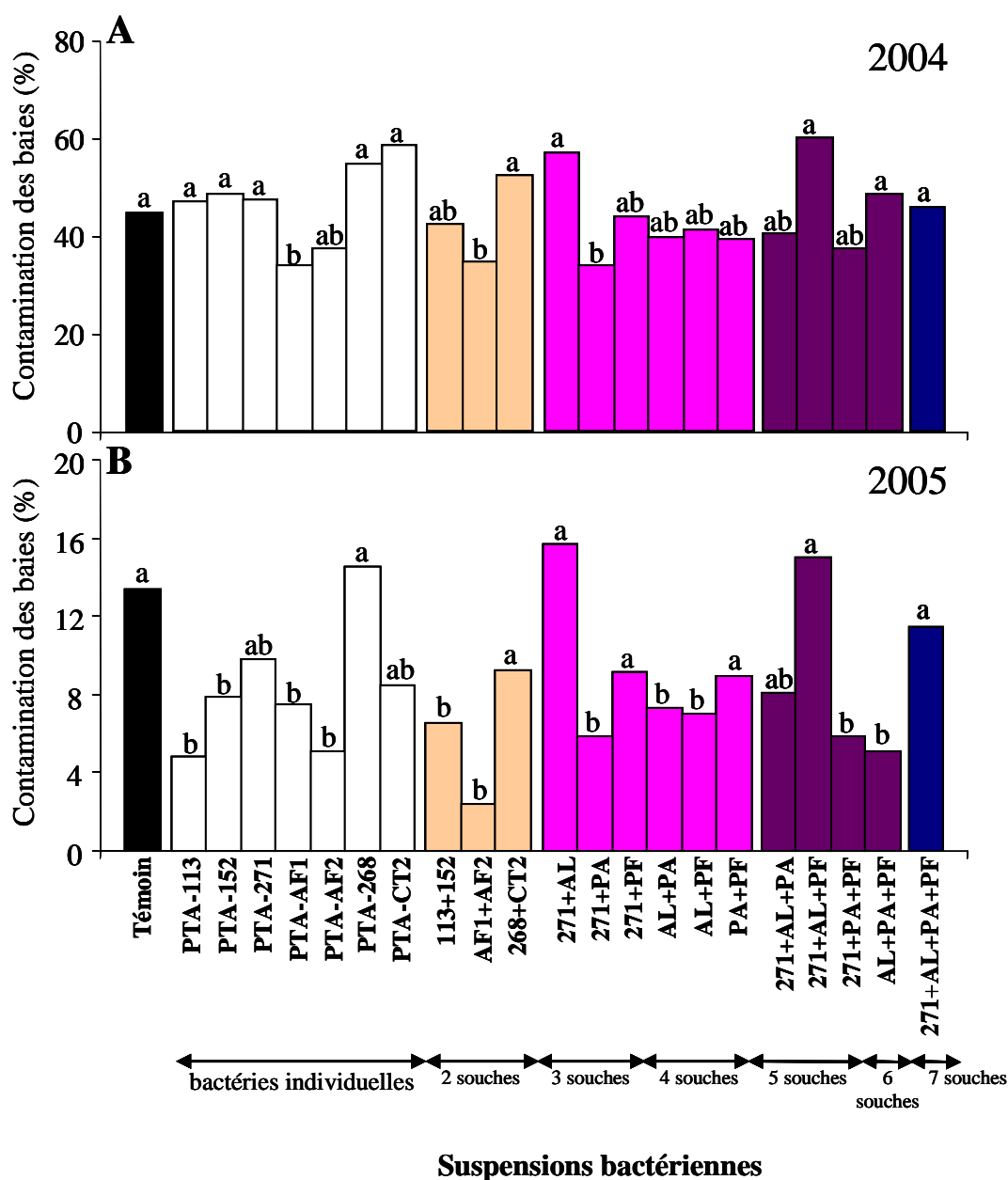


Figure 2 : Protection des baies de vignes contre *B. cinerea* par des mélanges de bactéries issues du vignoble. Les mélanges de souches ont été appliqués au sol du vignoble (NL) à une concentration finale de 10^8 UFC ml^{-1} (150 ml par plante) en 2003 et en 2004. En 2005, aucun traitement bactérien n'a été renouvelé. L'intensité de la contamination des baies par *B. cinerea* a été déterminée à la fin de la maturation le 28 octobre 2004 (A) et le 21 septembre 2005 (B) sur un total de 100 grappes par traitement. Les histogrammes ayant la même lettre ne sont pas significativement différents d'après le test de Duncan ($p < 0,05$). AL = 113+152, PA = AF1+AF2, PF = 268+CT2, MIX7 = 271+AL+PA+PF.

Concernant les combinaisons de trois ou quatre souches, seule l'association de *B. subtilis* PTA-271 associée aux deux *P. agglomerans* PA conduit à une protection significative des grappes contre *B. cinerea* (environ 24%). Cette protection est similaire à celle obtenue avec le mélange de deux *P. agglomerans* (AF1+AF2) (22%) (Figure 4 A), en particulier sur les grappes de la face Ouest (Tableau I). La combinaison des deux *P. agglomerans* PA montrant un effet protecteur à elle seule, ne procure aucun effet significatif lorsqu'elle est apportée au sol en présence du genre *A. lwoffii* AL ou de *P. fluorescens* PF (Figure 2A).

b. En l'absence d'un renouvellement annuel des bactéries

En 2005, les attaques des baies par *B. cinerea* ont été plus précoces qu'en 2004. Ainsi l'estimation de l'intensité de contamination des baies a pu être réalisée en pleine maturation (21 septembre 2005). Chez les plants témoins, la contamination des baies par *B. cinerea* est d'environ 13,4%, soit 3,3 fois inférieure à celle obtenue en 2004 (Figures 2 A et B). Dans la majorité des cas, le traitement des vignes par les mélanges de bactéries conduit à une protection significative des baies. Concernant les mélanges binaires, à l'exception de la combinaison des deux *P. fluorescens* (268+CT2) (Figure 2 B), l'application des deux *A. lwoffii* (113+152) ou des deux *P. agglomerans* (AF1+AF2) se traduit par une protection des baies comprise entre 50 et 80% (Figure 2 B). Dans le cas du mélange du *P. agglomerans* (AF1+AF2), cette protection est répartie de manière similaire entre la face Est et la face Ouest (Tableau I). Ces taux de protection sont relativement supérieurs à ceux retrouvés avec les bactéries appliquées séparément (Figure 2 B, Tableau I).

En réponse à l'application des combinaisons impliquant trois à quatre souches, le taux de protection reste variable selon la composition du mélange (Figure 2 B). Cette protection est fortement significative en réponse aux mélanges des souches *A. lwoffii* et *P. agglomerans* (AL+PA) (environ 45%), *A. lwoffii* et *P. fluorescens* (AL+PF) (47%) ou *B. subtilis* et *P. agglomerans* (271+PA) (56%) (Figure 2 B). Ces trois mélanges semblent particulièrement efficaces à protéger les grappes de la face Est contre *B. cinerea* (Tableau I). On remarque toutefois qu'en présence des mélanges combinant *P. agglomerans* PA avec *A. lwoffii* AL ou *P. agglomerans* PA avec *B. subtilis* (PTA-271), le niveau de protection n'atteint pas celui obtenu en présence du mélange *P. agglomerans* (AF1+AF2) (Figure 2 B). Les baies des plantes traitées avec les mélanges 271+AL ou PA+PF ne montrent aucune résistance à

Tableau I : Effet des mélanges de bactéries sur la protection des baies contre *B. cinerea*. Les essais ont été réalisés dans la parcelle NL en 2004 et 2005. Les mélanges des souches ont été appliqués au vignoble (NL) à une concentration finale de 10^8 UFC ml^{-1} par dépôt au sol (150 ml par vigne) en 2003 et en 2004. En 2005, aucun traitement bactérien n'a été renouvelé. L'intensité de la contamination des baies par *B. cinerea* a été déterminée le 28 octobre 2004 (soit à la fin de la maturation) et le 21 septembre 2005 sur 50 grappes de la face Est et 50 grappes de la face Ouest par traitement. Les valeurs (moyennes) suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan ($p < 0,05$, analyse de variance par colonne).

Traitements	2004		2005	
	Contamination des baies (%)		Contamination des baies (%)	
	Face Est	Face Ouest	Face Est	Face Ouest
Témoin	34,9 a	54,5 a	13,3 a	13,5 a
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	35,6 a	58,3 a	4,6 b	5,1 b
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	41,1 a	56,0 a	4,6 b	11,2 ab
<i>B. subtilis</i> PTA-271	34,7 a	59,8 a	7,7 b	11,9 ab
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	20,3 b	47,7 b	5,3 b	9,8 ab
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	33,9 ab	40,2 b	5,3 b	4,9 b
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	39,4 a	70,0 a	10,6 ab	18,4 a
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	48,8 a	68,0 a	3,7 b	13,4 a
AL	32,3 ab	53,4 a	3,1 b	9,8 a
PA	27,9 ab	41,4 b	3,2 b	1,6 b
PF	36,4 ab	68,2 c	9,5 a	8,9 ab
271+AL	43,8 a	69,7 c	14,9 a	16,6 a
271+PA	25,5 ab	41,4 b	4,8 b	7,0 ab
271+PF	36,1 a	51,4 a	7,6 ab	10,6 a
AL+PA	28,7 ab	50,6 a	6,8 b	7,8 ab
AL+PF	27,8 ab	54,7 a	4,8 b	9,2 ab
PA+PF	28,9 ab	49,3 ab	7,5 ab	10,3 a
271+AL+PA	27,3 a	51,7 a	6,8 b	9,4 ab
271+AL+PF	29,5 a	73,5 c	8,8 a	21,3 a
271+PA+PF	39,4 a	47,9 a	3,1 b	8,6 ab
AL+PA+PF	48,3 a	58,9 a	4,1 b	6,1 b
271+AL+PA+PF	28,6 a	63,4 a	10,5 a	12,4 a

AL = 113+153, PA = AF1+AF2, PF = 268+CT2, MIX7 = 271+AL+PA+PF

B. cinerea, alors que les mélanges binaires seuls d'*A. lwoffii* (113+152) et de *P. agglomerans* (AF1+AF2) se montrent efficaces contre *B. cinerea*.

Suite à l'application au sol du mélange de cinq souches (271+PA+PF) ou de six (AL+PA+PF), une réduction de l'intensité de contamination des baies d'environ 50 à 60% est obtenue (Figure 2 B). Dans ces conditions, le niveau de protection observé chez les plantes préalablement traitées avec *P. agglomerans* (AF1+AF2) n'est toujours pas atteint. On note aussi que le pourcentage de protection est relativement similaire entre les deux faces des rangs (Tableau I).

La fréquence de contamination des baies a également été évaluée en 2004 et en 2005 au vignoble. Il en ressort, qu'en 2004 et quelle que soit la ou les bactéries appliquées, le taux de fréquence de la pourriture grise n'est pas différent par rapport au témoin (Annexe 2 : Tableau I et III). Néanmoins, en 2005 les plantes préalablement traitées avec certains mélanges impliquant *A. lwoffii* et *P. agglomerans* seules ou en association, montrent une légère réduction de la fréquence de contamination des baies (Annexe 2 : Tableau II et IV).

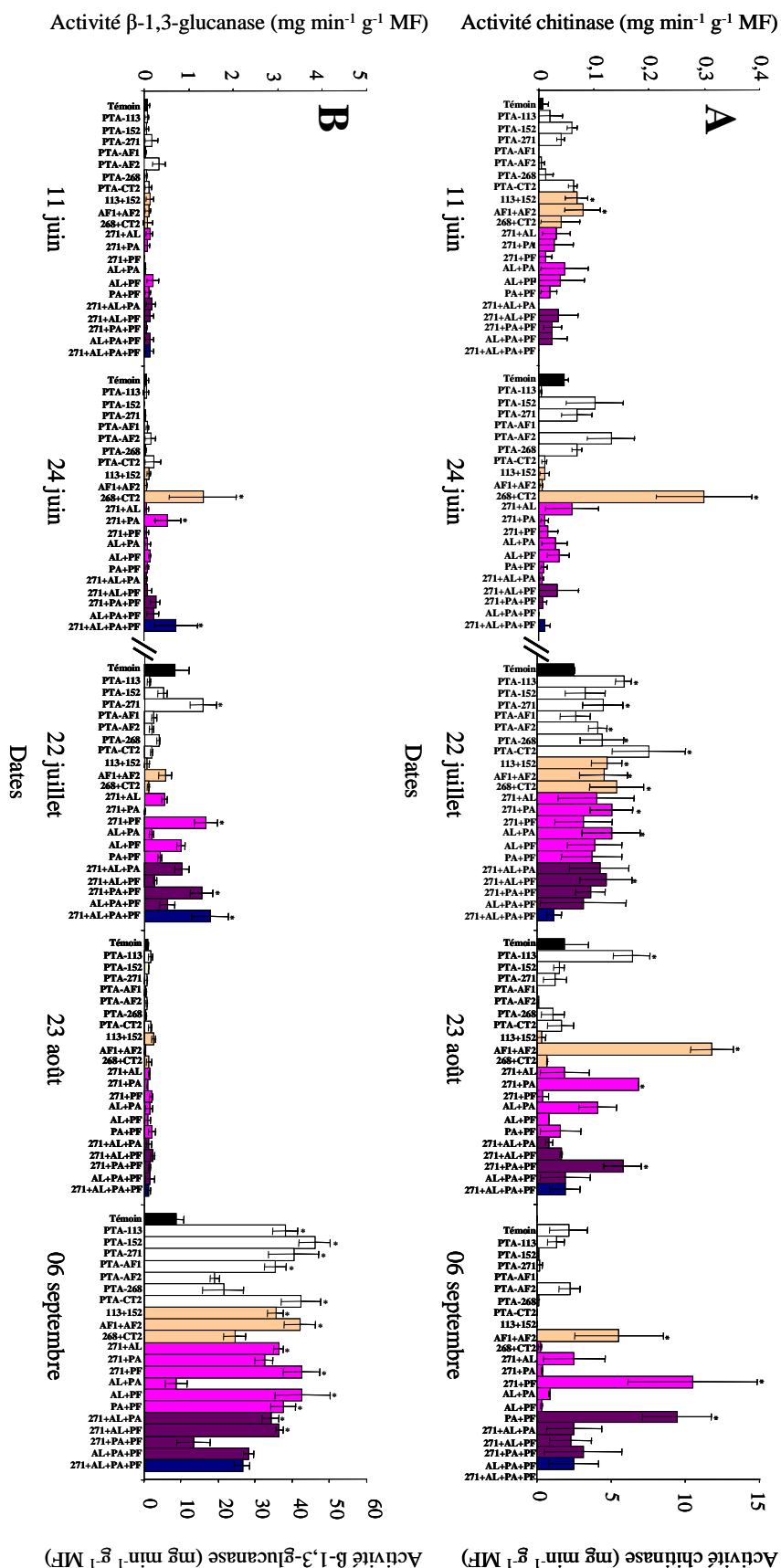
2.2 Effet des mélanges de bactéries sur les réactions de défense de la vigne

Les activités chitinase et β -1,3-glucanase ont été suivies du 11 juin au 6 septembre 2004 dans les feuilles et du 4 août au 14 octobre 2004 dans les baies suite à l'application des mélanges de bactéries au sol.

2.2.1 Activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles

a. Activité chitinase

L'activité chitinase dans les feuilles des plantes témoins est inférieure à $0,1 \text{ mg min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ depuis le stade " boutons floraux séparés " (début juin) jusqu'au stade "grains grosseur de la grenaille" (début juillet). Cette activité augmente fortement (d'un facteur 20) jusqu'à la fin août, ensuite diminue à partir de la fin de la véraison (début de septembre) jusqu'à atteindre son niveau initial (Figure 3 A). Suite à l'application des mélanges binaires de bactéries, l'activité chitinase est fortement stimulée dès le stade "boutons floraux séparés" (début juin). En effet, le mélange des deux *A. lwoffii* (113+152) ou celui des deux *P. agglomerans* (AF1+AF2) conduit à une activité environ 10 fois supérieure à celle du témoin (Figure 3 A). En présence du mélange des deux *P. fluorescens* (268+CT2), l'activité chitinase augmente d'un facteur de 6,7 par rapport au témoin à la "pleine floraison" (fin juin). Cette activité



semble précoce par rapport à celle observée en présence des bactéries appliquées individuellement. Puis à la "fermeture de la grappe", une stimulation de l'activité chitinase est à nouveau observée chez les feuilles des vignes traitées par les deux mélanges PTA-(AF1+AF2) et PTA-(268+CT2). L'application du couple *P. agglomerans* (AF1+AF2) se traduit aussi par une forte stimulation de l'activité chitinase (d'un facteur de 6,5) à la véraison (fin août), alors que le couple *P. fluorescens* (268+CT2) conduit à une stimulation de cette activité d'environ 5 fois supérieure à celle du témoin à la fin de la véraison (début septembre).

La combinaison de trois à quatre souches se traduit aussi par une stimulation de l'activité chitinase, mais à un niveau relativement faible et tardif par rapport à celui observé en présence des couples de souches correspondantes (Figure 3 A). En présence des trois souches 271+PA ou des quatre souches AL+PA, l'activité chitinase augmente au stade "fermeture de la grappe". Cette activité est maintenue à un niveau élevé jusqu'au début de la véraison en présence du mélange 271+PA et jusqu'à la fin de la véraison en présence du mélange AL+PA (Figure 3 A),

L'application des mélanges constitués de cinq à six souches conduit aussi à une activité chitinase d'un niveau similaire à celui observé en présence des combinaisons tertiaires et quaternaires de souches. Les mélanges les plus actifs en terme d'amplitude de cette réaction sont 271+AL+PF au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet), 271+PA+PF au début de la véraison (fin août) et 271+AL+PA à la fin de la véraison (début septembre) (Figure 3 A). On note par ailleurs que le niveau d'activité observé en présence de ce dernier mélange est comparable à celui atteint suite à l'application du mélange (AL+PA). Toutefois, l'application du mélange combinant les sept souches (MIX 7) ne conduit à aucune stimulation significative de l'activité chitinase.

b. Activité β -1,3-glucanase

Le profil d'évolution de l'activité β -1,3-glucanase est différent de celui de l'activité chitinase chez les feuilles de vigne (Figure 3 B). En effet, chez le témoin cette activité est de l'ordre de 0,1 à 0,2 unités au cours des premiers mois de développement de la vigne. L'activité β -1,3-glucanase augmente ensuite et atteint une valeur d'environ 8 unités au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet). Le même niveau d'activité important est observé au début du mois de septembre, après une chute de celle-ci en début de véraison (mi-août). Dans la majorité des cas, l'application au sol des bactéries se traduit par une augmentation de

l'activité β -1,3-glucanase, dont l'amplitude et la cinétique varient en fonction du traitement (Figure 3 B).

L'application des mélanges du couple *P. fluorescens* (268+CT2) conduit à une stimulation de l'activité β -1,3-glucanase dès le stade "pleine floraison" (fin juin), alors qu'en présence des mélanges des deux *A. lwoffii* (113+152) ou des deux *P. agglomerans* (AF1+AF2), cette activité est stimulée plus tardivement (à partir de la "pleine véraison") (Figure 3 B). On note par ailleurs qu'en fin de véraison, ce niveau d'activité observé est équivalent à celui induit par chaque bactérie appliquée individuellement.

La cinétique de l'activité β -1,3-glucanase est aussi variable en réponse aux mélanges tertiaires et quaternaires de souches. Suite à l'application des trois souches appartenant à *B. subtilis* et *P. agglomerans* (271+PA), l'activité β -1,3-glucanase des feuilles est 10 fois supérieure à celle du témoin dès le stade "pleine floraison" (fin juin). L'apport au sol des combinaisons des trois souches 271+PF ou 271+AL et des quatre AL+PF ou PA+PF se traduit quant à elles par une stimulation tardive de l'activité β -1,3-glucanase. Cette activité est d'environ 2 à 5 fois supérieure à celle du témoin à partir du stade "fermeture de la grappe" pour le mélange 271+PF (Figure 3 B), et à la fin de la véraison pour les mélanges 271+AL, AL+PF et PA+PF. Les mélanges contenant cinq souches, en particulier 271+AL+PA, 271+AL+PF et 271+PA+PF et de sept souches (MIX 7) stimulent également l'activité β -1,3-glucanase dans les feuilles de vigne (Figure 3 B).

2.2.2 Activités chitinase et β -1,3-glucanase dans les baies

a. Activité chitinase

Dans les baies, l'activité chitinase est déterminée au stade "fermeture de la grappe" (début août) et à la fin de maturation (mi-octobre) suite à l'application des mélanges de bactéries au sol en 2004. En réponse au mélange binaire de bactéries, seule la combinaison des deux *P. fluorescens* (268+CT2) est capable d'induire une activité chitinase dans les baies au stade "fermeture de la grappe" (Figure 4 A). Aucune activité significative n'a été observée en réponse aux autres couples de bactéries, alors qu'en présence de chaque bactérie seule composant ces mélanges, l'activité chitinase dans les baies est fortement stimulée (Figure 4 A).

La combinaison des trois souches 271+PA conduit aussi à une stimulation de l'activité chitinase dans les baies à partir du début de la véraison. Des pics d'activité chitinase sont

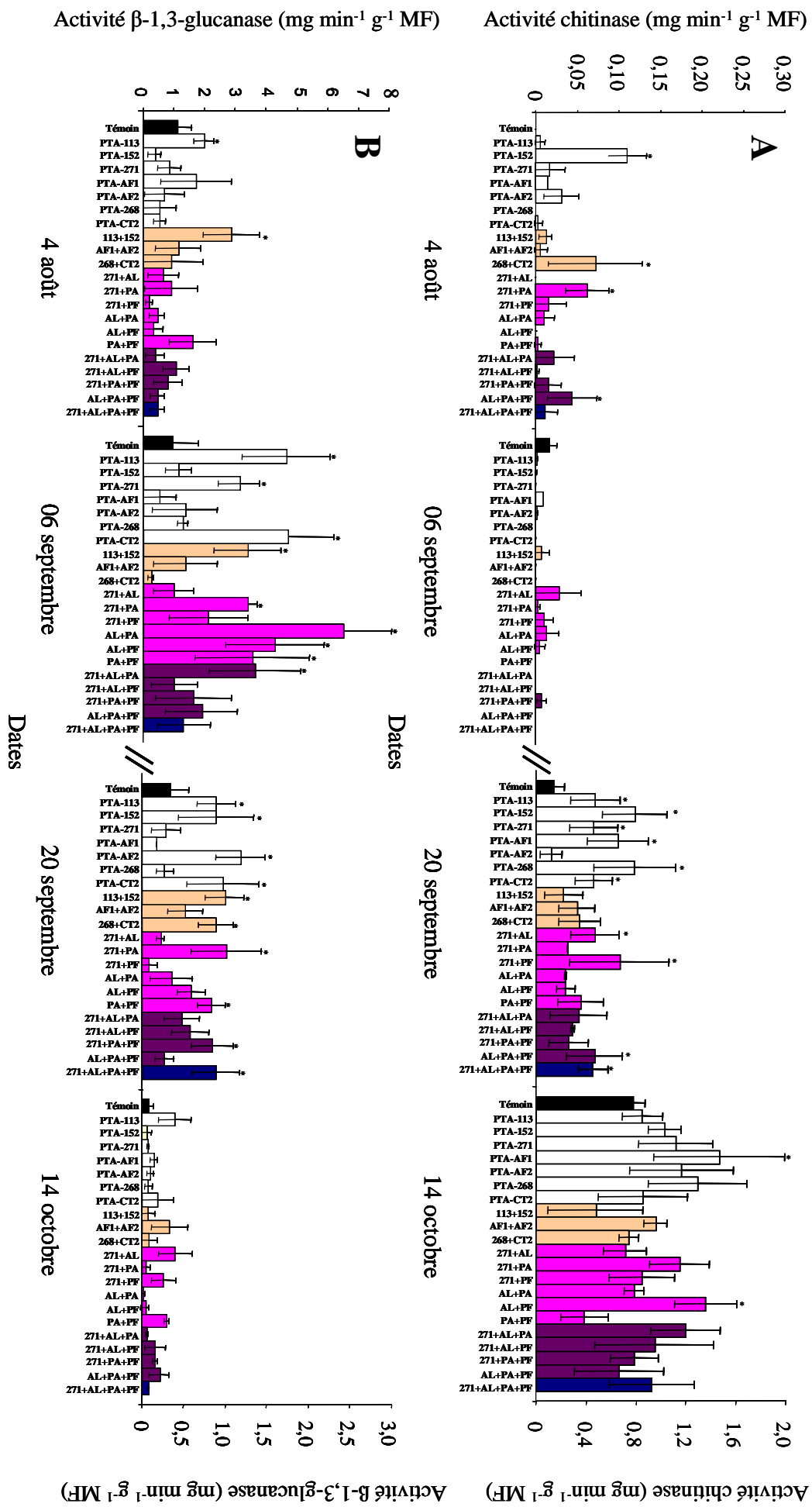


Figure 4 : Activités chitinase (A) et β-1,3-glucanase (B) dans les baies de vigne suite à l'application des mélanges de bactéries au vignoble. Les essais ont été réalisés en 2004. Les bactéries *A. woffii* PTA-113, *A. woffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268, *P. fluorescens* PTA-CT2, les mélanges binaires de souches (AL=113+152, PA=AF1+AF2, PF=268+CT2), de trois, de quatre, de cinq, de six et de sept souches ont été appliqués à une concentration finale de 1x10⁸ UFC ml⁻¹ au niveau du sol (parcelle NL) le 20 mai 2004. Les valeurs représentent les moyennes (n=3) ± l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

également observés à la maturation des fruits chez les vignes traitées par les combinaisons de trois souches 271+AL ou 271+PF. Une forte activité est observée chez les vignes traitées par le mélange de quatre souches AL+PF à la fin de la maturation (Figure 4 A). Parmi les mélanges contenant cinq ou six souches, seule la combinaison AL+PA+PF stimule l'activité chitinase dans les baies au début de la véraison et à la maturation des fruits (Figure 4 A). A ce stade, le mélange des sept souches (MIX 7) conduit aussi à une activité chitinase supérieure à celle du témoin.

b. Activité β -1,3-glucanase

A l'inverse de l'activité chitinase, l'activité β -1,3-glucanase des baies diminue de façon régulière au cours de la maturation des baies chez le témoin (Figure 4 B). L'application du mélange des deux souches d'*A. lwoffii* (113+152) stimule l'activité β -1,3-glucanase dans les baies depuis le début de la véraison jusqu'à la maturation des fruits.

Le profil de cette activité reste comparable à celui observé en présence d'*A. lwoffii* PTA-113 seule. L'apport au sol des autres mélanges binaires *P. agglomerans* (AF1+AF2) et *P. fluorescens* (268+CT2) ne stimule que faiblement cette activité.

L'application de combinaisons de trois ou quatre souches se traduit dans la majorité des cas par une stimulation de l'activité β -1,3-glucanase dans les baies (Figure 4 B). A l'exception des combinaisons 271+AL ou 271+PF, les autres mélanges de trois (271+PA) ou de quatre souches (AL+PA), (AL+PF) ou (PA+PF) sont capables de stimuler l'activité β -1,3-glucanase dès la mi-véraison (Figure 4 B).

L'activité β -1,3-glucanase dans les baies est également supérieure à celle du témoin suite à l'application des mélanges de 5 souches. Cette activité est d'autant plus importante à la fin de la véraison en présence du mélange 271+AL+PA, et en pleine maturation en présence du mélange 271+PA+PF. L'application du mélange de sept souches (MIX7) conduit aussi à une stimulation significative de l'activité β -1,3-glucanase, en particulier à la pleine maturation des fruits (Figure 4 B).

2.2.3 Activité de la phénylalanine ammonia lyase (PAL) dans les feuilles de vigne suite à l'application des mélanges de bactéries au vignoble

L'activité PAL des feuilles de vigne a été suivie après un mois d'application de bactéries au sol (le 25 mai 2003). Chez les feuilles témoins, l'activité PAL augmente légèrement depuis le stade "pleine floraison" (fin juin) jusqu'au début de la véraison (mi-août). Suite à l'application des mélanges de bactéries, les feuilles expriment une activité PAL dont le niveau

est variable selon les souches (Figure 5). L'apport au sol du mélange binaire *A. lwoffii* (113+152) stimule l'activité de la PAL dans les feuilles de vigne au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet), avec un niveau sensiblement supérieur à celui induit par chacune des souches appliquée individuellement (PTA-113 ou PTA-152) (Figure 5). Le mélange des deux *P. agglomerans* (AF1+AF2) ne provoque aucune stimulation de l'activité PAL, alors qu'une activité significative et transitoire a été observée en présence de la souche *P. agglomerans* PTA-AF1 seule. En réponse au mélange des deux *P. fluorescens* (268+CT2), l'activité PAL est légèrement stimulée en début juillet et atteint des niveaux importants en début de la véraison (mi-août) (Figure 5). Aucune stimulation de cette activité n'a été observée suite à l'application de chacune des deux souches constitutive du mélange, prise séparément (Figure 5).

Lorsque les plantes sont traitées avec trois ou quatre souches en mélange, l'activité PAL augmente significativement dans les feuilles. Le niveau de cette activité est au moins équivalent, voire supérieur, à celui atteint avec les souches constituant ces mélanges. Les mélanges les plus actifs sont représentés par 271+PA, AL+PA, AL+PF et PA+PF (Figure 5).

Le mélange de cinq souches 271+AL+PA conduit aussi à une activité PAL environ deux fois supérieure à celle des vignes témoin au stade "grains grosseur de la grenaille" (fin juin) (Figure 5). Au stade "grains taille de petit pois" (début juillet), l'activité PAL est également stimulée dans les feuilles des vignes traitées par le mélange AL+PA+PF. Le mélange 271+PA+PF stimule également l'activité PAL au moment de la véraison (mi-août) (Figure 5). Le mélange de sept souches ne stimule pas significativement l'activité PAL. Après le 15 juillet, l'activité PAL est équivalente à celle du témoin en réponse aux mélanges contenant plus de cinq souches.

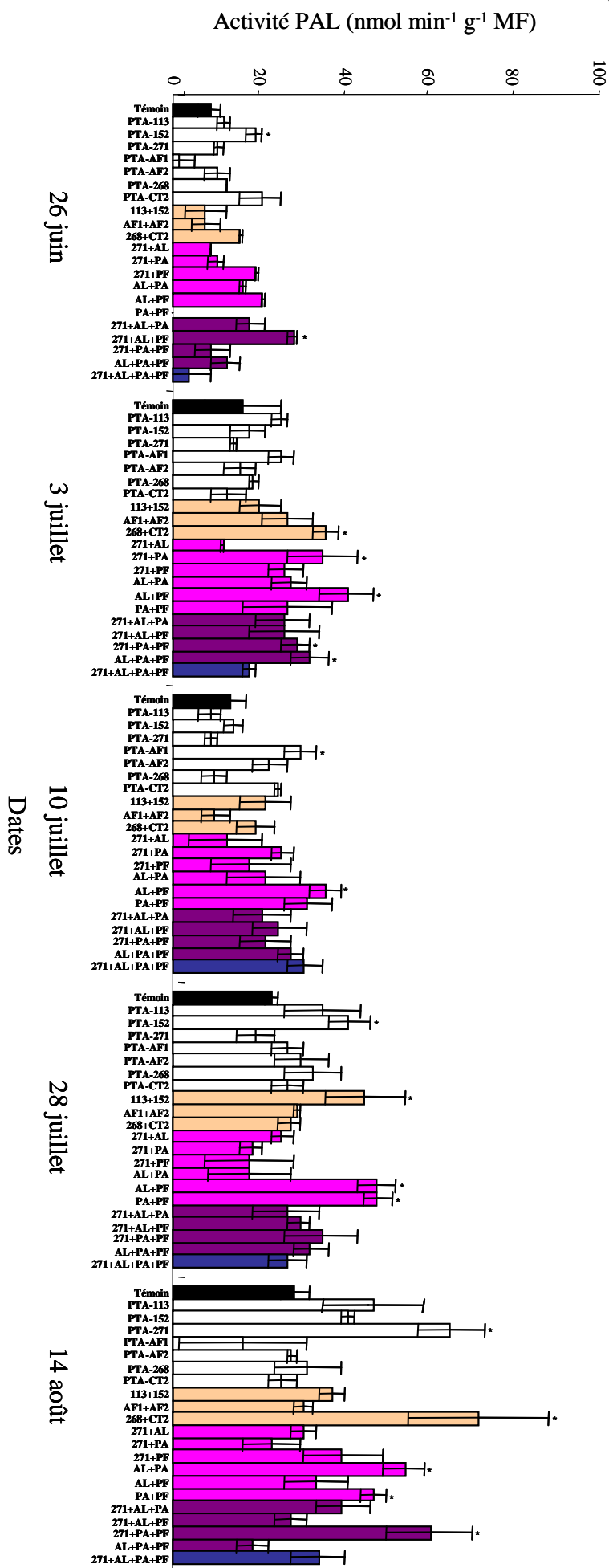


Figure 5 : Activité phénylalanine lyase (PAL) dans les feuilles de vigne suite à l'application des mélanges de bactéries au vignoble. Les essais ont été réalisés en 2003. Les bactéries *A. woffii* PTA-113, *A. woffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268, *P. fluorescens* PTA-CT2, les mélanges binaires de souches (AL=113+152, PA=AF1+AF2, PF=268+CT2), de trois, de quatre, de cinq, de six et de sept souches ont été appliqués à une concentration finale de 1x10⁸ UFC ml⁻¹ au niveau du sol (parcelle NI) le 10 juin 2003. Les valeurs représentent les moyennes (n=3) ± l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

2.3 Approche comparative des effets de différentes méthodes d'application des mélanges bactériens

2.3.1 Effet sur la protection des feuilles contre *B. cinerea*

Différents mélanges constitués de deux, trois, quatre ou sept souches ont été appliqués au vignoble en 2003 et en 2004 selon trois méthodes différentes : par infiltration dans les bourgeons, par pulvérisation foliaire ou par apport au sol, à une concentration finale de 10^8 UFC ml⁻¹. Les effets protecteurs contre *B. cinerea* de ces mélanges ont été évalués sur feuilles deux mois après leur application. La contamination est déterminée par mesure de la taille de la nécrose 7 jours après contamination.

a. Infiltration dans les bourgeons

L'infiltration des mélanges composés des deux *P. fluorescens* (268+CT2) ou de sept souches (MIX 7) conduit à une protection significative des feuilles de l'ordre de 35 et 44%, respectivement (Figure 6 A). Dans les mêmes conditions, le mélange des deux *P. agglomerans* (AF1+AF2) ne procure aucune protection significative contre *B. cinerea*, malgré une forte protection (50 %) induite par *P. agglomerans* PTA-AF1 (Figure 6 A).

b. Pulvérisation sur feuilles

La pulvérisation des mélanges *P. agglomerans* (AF1+AF2) et du MIX 7 se traduit elle aussi par une réduction significative de la nécrose (entre 15 et 35%) (Figure 6 B). Le traitement des feuilles par les deux *P. fluorescens* n'aboutit pas à un effet protecteur, alors que la pulvérisation de *P. fluorescens* PTA-CT2 seule semble être plus efficace vis-à-vis de *B. cinerea*.

c. Application au sol

L'enrichissement du sol par les mélanges des deux bactéries du genre *P. fluorescens* (268+CT2) et du MIX 7 conduit à une protection des feuilles d'environ 34% (Figure 6 C). On note aussi que malgré une protection significative (42-50%) obtenue en présence de *P. agglomerans* PTA-AF1 ou de *P. agglomerans* PTA-AF2 séparément, le mélange de ces deux souches ne conduit pas à une réduction significative des attaques foliaires de *B. cinerea*.

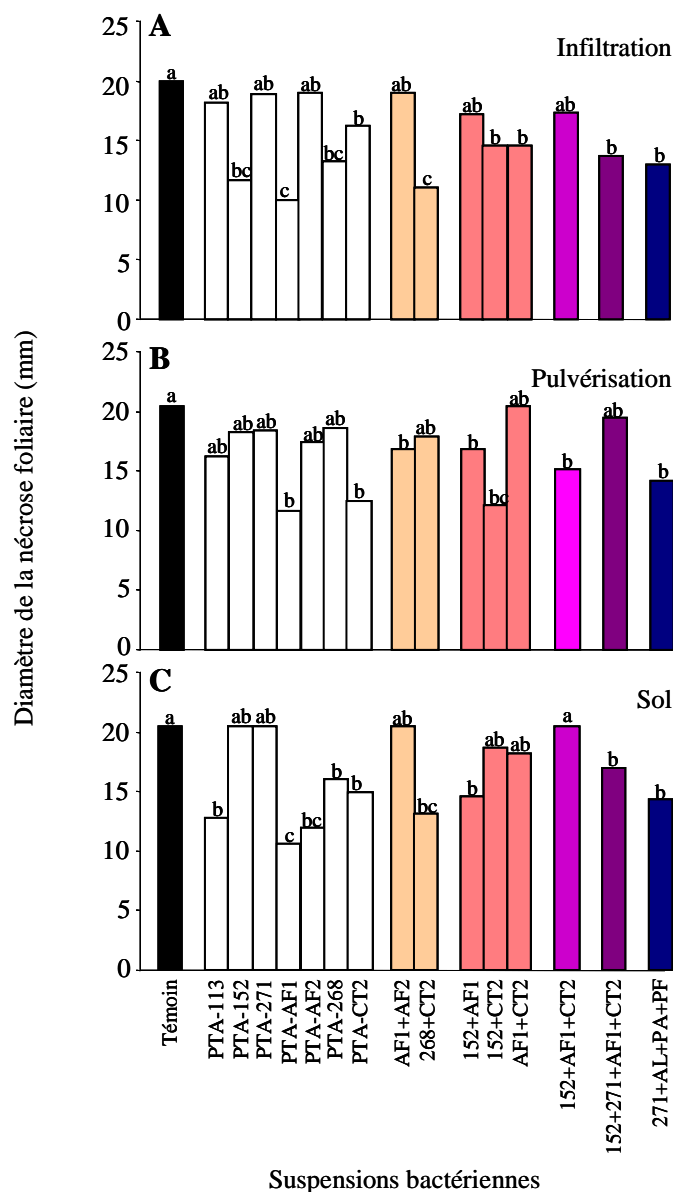


Figure 6 : Protection des feuilles de vigne contre *B. cinerea* par des mélanges de bactéries en relation avec leur méthode d'application au vignoble. Les bactéries *A. lwoffii* PTA-113, *A. lwoffii* PTA-152, *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2, *P. fluorescens* PTA-268, *P. fluorescens* PTA-CT2 et les mélanges de bactéries ont été appliqués au vignoble (CR) à une concentration finale de 10^8 UFC ml^{-1} par infiltration (A), pulvérisation (B) ou par dépôt au sol (C) en début de saisons 2003 et 2004. Les tests de protection ont été réalisés deux mois après l'application des bactéries au vignoble (soit le 13 juillet 2004). Les feuilles ont été prélevées puis inoculées artificiellement au laboratoire avec une suspension conidienne de *B. cinerea* à 1×10^5 spores ml^{-1} . La contamination des feuilles (diamètre de la nécrose) a été estimée 7 j post-inoculation. Les valeurs représentent les moyennes des nécroses sur 20 à 30 feuilles par traitement. Les valeurs des histogrammes ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan ($p < 0,05$). AL = 113+152, PA = AF1+AF2, PF = 268+CT2, MIX7 = 271+AL+PA+PF.

2.3.2 Effets sur les réactions de défense de la vigne

Les réactions mesurées correspondent aux activités chitinase et β -1,3-glucanase. Ces activités ont été mesurées dans les feuilles et dans les baies suite à l'application de deux mélanges, un constitué de quatre souches représentatives des quatre genres étudiés : 152+271+AF1+CT2 (MIX4) et l'autre constitué des sept souches (MIX7). Ces mélanges ont été appliqués en 2003 par infiltration dans les bourgeons, par pulvérisation foliaire ou directement au niveau du sol.

a. Activité chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles

Activité chitinase

L'activité chitinase des feuilles de vigne a été suivie du 12 juin au 29 août 2003 (Figure 7 A, B). Chez le témoin, l'activité chitinase varie au cours de la saison, avec une augmentation importante et transitoire au stade "fermeture de la grappe" (fin juillet).

Suite à l'infiltration des bactéries, seul le mélange MIX4 conduit à une stimulation significative de l'activité chitinase, en particulier aux stades "boutons floraux séparés" (mi-juin) et "fermeture de la grappe" (fin juillet). Le MIX7 quant à lui n'exerce pas d'effets sur cette réaction.

Lorsque les deux mélanges sont appliqués par pulvérisation, les feuilles expriment une activité chitinase supérieure à celle du témoin au stade "boutons floraux séparés" (Figure II.7 B). Cette activité est fortement stimulée au cours du mois de juillet suite à l'application des deux mélanges, le MIX4 étant plus actif.

L'enrichissement du sol par le mélange MIX4 se traduit aussi par une stimulation de l'activité chitinase d'environ un facteur 2,3 au moment de "fermeture de la grappe" (fin juillet). Le MIX7, quant à lui stimule l'activité chitinase de manière plus précoce, mais d'une amplitude moins importante. (Figure 7 B).

Activité β -1,3-glucanase

L'activité β -1,3-glucanase a été déterminée dans les feuilles aux stades "fermeture de la grappe" (fin juillet) et à la fin de véraison (début septembre) (Figures 7 C, D). Cette activité est stimulée au stade "fermeture de la grappe" suite à l'application du mélange de sept souches (MIX7). Par contre, le mélange constitué de quatre souches (MIX4) n'exerce pas

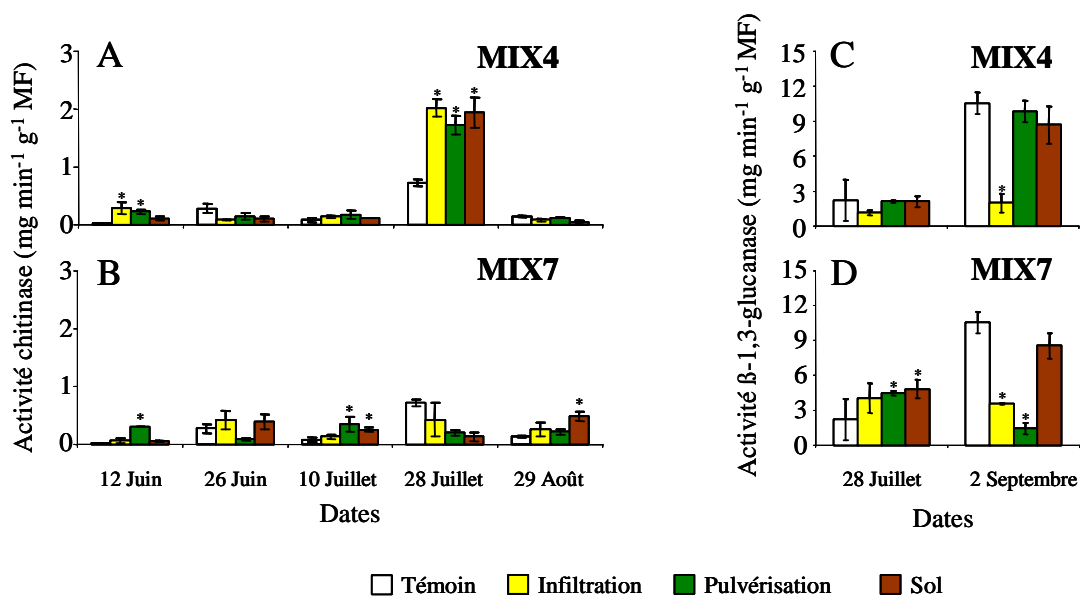


Figure 7 : Activités chitinase (A, B) et β -1,3-glucanase (C, D) dans les feuilles de vigne suite à l'application de deux mélanges de bactéries MIX4 et MIX7 au vignoble. Les mélanges MIX4 (152+271+AF1+CT2) et MIX7 (271+AL+PA+PF) ont été appliqués à une concentration finale de 1×10^8 UFC ml⁻¹ dans la parcelle CR par infiltration, pulvérisation et au niveau du sol en 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) \pm l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$). AL = 113+152, PA = AF1+AF2, PF = 268+CT2.

d'effet à ce stade. Aucune augmentation de cette activité n'a été observée à la fin de la véraison (Figure 7 D). A l'inverse, une baisse significative a été observée chez les feuilles des plantes infiltrées et pulvérisée par les deux mélanges.

b. Activité chitinase et β -1,3-glucanase dans les baies

Activité chitinase

L'activité chitinase des baies a été déterminée à trois stades différents, "fermeture des grappes" (fin juillet), début (mi-août) et fin de la véraison (début septembre). Parmi les trois méthodes d'application étudiées, seule l'infiltration du mélange MIX4 dans les bourgeons se traduit par une stimulation de l'activité chitinase dans les baies (Figure 8 A). Cette activité est d'environ 2,5 à 3 fois supérieure à celle du témoin au stade "fermeture de la grappe" et au début de la véraison. A ce dernier stade, la pulvérisation de MIX7 se traduit également par une légère stimulation de l'activité chitinase dans les baies (Figure 8 B). A la fin de la véraison, l'augmentation de l'activité chitinase dans les baies est quasi-similaire à celle du témoin, quel que soit le mélange et la méthode d'application des bactéries.

Activité β -1,3-glucanase

L'activité β -1,3-glucanase a été déterminée dans les baies aux stades fermeture de la grappe (fin juillet) et à la fin de véraison (début septembre) suite à l'application des mélanges MIX4 et MIX7. La pulvérisation et l'application au sol du mélange MIX4 se traduisent par une stimulation significative de l'activité β -1,3-glucanase à la mi-véraison, alors que l'infiltration de ce mélange ne provoque pas d'effet sur cette réaction. En réponse au mélange MIX7, l'activité β -1,3-glucanase est fortement stimulée au stade fermeture de la grappe, quelle que soit la méthode de l'application des bactéries au vignoble (Figure 8 B). A la fin de la véraison, seules les baies des vignes dont les bourgeons ont été infiltrés et le sol a été enrichi par le mélange MIX 7 expriment une activité β -1,3-glucanase supérieure à celle des baies témoins.

Comme dans le cas de l'application des bactéries individuelles (cf. chapitre 1), ces résultats montrent que les niveaux d'activités enzymatiques dépendent de la méthode d'application et des mélanges de bactéries. L'apport du mélange MIX7, en particulier par pulvérisation, conduit à une stimulation de l'activité chitinase plus précoces dans des feuilles

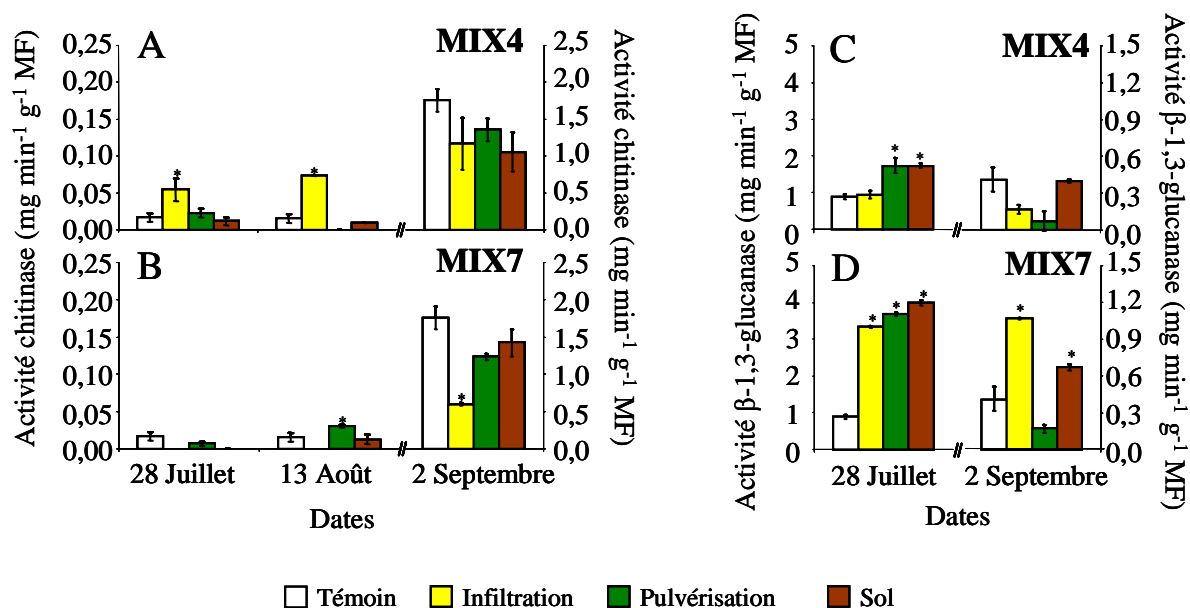


Figure 8 : Activités chitinase (A, B) et β-1,3-glucanase (C, D) dans les baies de vigne suite à l'application de deux mélanges de bactéries MIX4 et MIX7 au vignoble. Les mélanges MIX4 (152+271+AF1+CT2) et MIX7 (271+AL+PA+PF) ont été appliqués à une concentration finale de 1×10^8 UFC ml⁻¹ dans la parcelle CR par infiltration, pulvérisation et au niveau du sol en 2003. Les valeurs représentent les moyennes ($n=3$) ± l'erreur standard. L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$). AL = 113+152, PA = AF1+AF2, PF = 268+CT2.

par rapport à celle observée avec les bactéries individuelles. L'application du MIX7, via les trois méthodes se traduit aussi par une stimulation de l'activité β -1,3-glucanase dans les baies avec des niveaux similaires à ceux induits par *P. agglomerans* PTA-AF1, *P. agglomerans* PTA-AF2 et *P. fluorescens* PTA-268.

3 Discussion

L'application d'un agent de lutte biologique dans des conditions du vignoble peut conduire à l'établissement d'interactions multiples avec d'autres microorganismes de la rhizosphère, qu'ils soient bénéfiques ou pathogènes. Dans ces conditions, l'efficacité de la lutte biologique peut dépendre à la fois d'un effet antagoniste ou synergique entre les différents microorganismes. Dans cette étude, afin d'optimiser la protection de la vigne contre *B. cinerea* au vignoble, diverses combinaisons de deux à sept souches de bactéries sélectionnées ont été étudiées. Les tests relatifs à la résistance de la plante ont permis de montrer qu'en 2004, l'application des mélanges de bactéries au sol se traduit par une protection significative des feuilles vis-à-vis de *B. cinerea*. Cette protection concerne particulièrement certaines combinaisons composées de *P. agglomerans* PA, AL+PA, 271+PA, PA+PF, AL+271+PA, AL+PA+PF, 271+PA+PF ou encore AL+271 et 271+PF. Malgré une protection significative induite par ces combinaisons de souches, elle reste néanmoins équivalente voire inférieure à celle observée en présence des souches individuelles (constitutives de ces mélanges). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez la pomme de terre (de la Cruz *et al.*, 1992), le radis (De Boer *et al.*, 1999) et le concombre (Roberts *et al.*, 2005). Ces effets peuvent être liés à la multiplication et à la concentration des bactéries dans le sol et /ou dans les tissus de la plante (Raaijmakers *et al.*, 1995).

Certaines combinaisons de souches sélectionnées, en particulier l'association des deux *A. lwoffii* (113+152) et /ou des deux *P. fluorescens* (268+CT2) ne procurent aucun effet protecteur des feuilles de vigne contre *B. cinerea*. L'absence d'effet protecteur pourrait relever de différents mécanismes impliquant l'antagonisme direct entre les souches constitutives de ces combinaisons, entre ces souches et d'autres microorganismes présents dans le sol ou encore entre ces microorganismes et les populations endophytes. Dans ce contexte, des études réalisées chez la tomate (Larkin et Fravel, 1998) et le radis (De Boer *et al.*, 1999) ont montré que l'application des mélanges de bactéries n'aboutit pas toujours à une réduction des attaques de *Fusarium oxysporum*, comme elle a été observée avec ces mêmes bactéries appliquées individuellement. Il a également été rapporté que les populations

bactériennes de la rhizosphère représentent souvent une importante communauté compétitive pouvant contrôler la survie des bactéries introduites et donc leur capacité à agir comme agents de lutte biologique (Van Veen *et al.*, 1997).

Une certaine protection des baies contre *B. cinerea* a également été observée suite à l'application au sol des mélanges de bactéries. Les combinaisons les plus efficaces sont représentées par les deux *P. agglomerans* (AF1+AF2), en présence ou non de *B. subtilis* (271+PA). Ces combinaisons se sont également avérées efficaces chez les feuilles. Néanmoins, malgré un taux de protection supérieur à celui mesuré avec les bactéries individuelles, les valeurs obtenues suggèrent qu'il n'y a aucun effet synergique entre les bactéries, lorsqu'elles sont appliquées en mélange. L'absence de synergie pourrait être expliquée par une faible concentration individuelle des bactéries appliquées. Des résultats similaires ont été observés chez d'autres plantes traitées par des combinaisons de différentes bactéries (Schisler, 1997 ; Dunne *et al.*, 1998 ; De Boer *et al.*, 1999 ; Fukui *et al.*, 1999 ; De Boer *et al.*, 2003), ou de bactéries avec des champignons (Janisiewicz et Bors, 1995 ; Leibinger *et al.*, 1997 ; Mao *et al.*, 1998 ; Guetsky *et al.*, 2002a). Cependant, dans cette étude l'association des sept souches (MIX7) ne se traduit pas par une protection significative des baies contre *B. cinerea*. Ce résultat renvoie à l'hypothèse d'un antagonisme entre les différences souches, pouvant impliquer des mécanismes de compétition ou d'antibiose.

Un maintien, voire une amélioration, de la protection de la vigne est enregistré en 2005 sans nouvelle application des bactéries au vignoble. Cette protection varie entre 40 et 80% sur les plantes de vigne ayant été traitées pendant les années passées par des mélanges de souches. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait une réitération des bactéries dans le sol et que leur maintien dans la plante est possible. Ceci pourrait être à l'origine de l'augmentation de la concentration en bactérie au cours du développement de la vigne favorisant ainsi une amplification de la résistance induite (Leibinger *et al.*, 1997 ; Schisler, 1997 ; Nunes *et al.*, 2001). En effet, il a été rapporté qu'un seuil minimum de concentration bactérienne au niveau des racines est nécessaire pour induire une protection des plantes contre *Fusarium oxysporum* (Raaijmakers *et al.*, 1995; Larkin et Fravel, 1999). Une corrélation positive a été établie entre la densité des populations de *Pseudomonas fluorescens* et le niveau de protection contre *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* chez le blé et contre *Fusarium oxysporum* chez le radis (Bull *et al.*, 1991 ; Raaijmakers *et al.*, 1995).

Par ailleurs, le niveau de protection obtenu en 2005 (généralement supérieur à celui obtenu en 2004) pourrait être lié à une faible contamination des baies par *B. cinerea*. Ces

résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par ailleurs (Ferreira, 1990, Boland, 1997 ; Hervas *et al.*, 1997 ; Larkin et Fravel, 1999 ; Fukui *et al.*, 1999 ; Landa *et al.*, 2001, Schmidt *et al.*, 2004), montrant que la lutte biologique à l'aide de bactéries est plus efficace lorsque la pression parasitaire est faible. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à cette protection. Elle peut résulter de conditions défavorables pour le développement du pathogène ou favorables en rendant la plante plus réceptive aux bactéries, mais encore d'un stress environnemental pouvant contribuer à la mise en place de la résistance de la plante.

Les résultats obtenus au vignoble montrent que les bactéries locales sont capables d'induire l'activité des enzymes hydrolytiques, chitinase et β -1,3-glucanase dans les feuilles et dans les baies de vigne. Ces réactions typiques de défense sont variables suivant la combinaison de souches appliquée et sont pour la plupart associées à une protection des différents organes de la vigne contre *B. cinerea*. De fortes activités chitinase et β -1,3-glucanase sont enregistrées suite à l'apport des mélanges de bactéries tels que 113+152, AF1+AF2, 268+CT2, AL+PA, AL+PF, AL+271+PF, 271+PA+PF. Ces réactions sont plus importantes avant la pleine floraison dans les feuilles et au début de la véraison dans les baies. Pour autant, une variabilité dans l'induction de ces mécanismes de défense a été observée. Quoi qu'il en soit, la protection contre *B. cinerea* au vignoble est positivement corrélée à ces réactions de défense. Les combinaisons 268+CT2 ou 271+PA semblent d'avantage induire l'activité chitinase alors que l'activité β -1,3-glucanase apparaît plutôt induite par les mélanges de souches AL+PF ou PA+PF. Ces réactions sont également induites chez d'autres plantes suite à l'inoculation de certaines bactéries de type *Pseudomonas* (Cartieaux *et al.*, 2003). Chez la vigne, les chitinases et les β -1,3-glucanases sont stimulées au cours de son interaction avec de nombreux pathogènes (Busam *et al.*, 1997, Derckel *et al.*, 1999 ; Robert *et al.*, 2002), mais aussi en réponse à différents éliciteurs (Repka *et al.* 2000, Aziz *et al.*, 2003 ; 2004 ; Trotel-Aziz *et al.*, 2006) et suite à l'exposition des feuilles aux UV (Bonomelli *et al.*, 2004).

Les chitinase et β -1,3-glucanase sont des protéines PR qui *via* leur action directe sont capables d'hydrolyser les constituants pariétaux de différents pathogènes (Derckel *et al.*, 1999). Par ailleurs, on peut noter que ces réactions sont plus précoces dans les feuilles en réponse aux mélanges de bactéries par comparaison aux bactéries individuelles. Ces réactions de défense locale peuvent contribuer à limiter au moins partiellement le développement du pathogène sur le plan spatio-temporel, les réactions induites et la protection sous-jacente nous indiquent que les bactéries locales sont capables d'induire une résistance systémique chez la vigne.

L'application de certains mélanges de bactéries induit également une stimulation transitoire de l'activité PAL chez les feuilles. Les mélanges de bactéries les plus performants sont constitués de 113+152, 268+CT2, AL+271, AL+PA, AL+PF, 271+PF, PA+PF, AL+271+PF, 271+PA+PF. La PAL est une enzyme clef impliquée dans la synthèse de nombreuses molécules de défense (phytoalexines, composés pariétaux, SA...). Ces composés jouent un rôle important dans la résistance de la plante aux pathogènes (Borie *et al.*, 2004) et certains d'entre eux pourraient aussi être impliqués dans l'induction d'autres réactions de défense (Métraux *et al.*, 1990 ; Ward *et al.*, 1991). Différentes formes de phytoalexines sont également accumulées dans les feuilles et dans les baies de vigne suite à l'application des mélanges de bactéries au sol (Verhagen *et al.*, communication personnelle).

La comparaison des différentes méthodes d'application des mélanges de bactéries au vignoble rend compte de leur efficacité lorsqu'ils sont apportés au sol. Dans ces conditions, le niveau de protection ainsi que celui des réactions de défense induites sont relativement importants par comparaison aux autres méthodes. Le mélange des 7 souches semble cependant efficace quelle que soit la méthode de son application au vignoble. Ces résultats suggèrent que le mode d'application des bactéries serait déterminant dans l'optimisation de la lutte biologique au vignoble, comme il a été rapporté chez le blé (Mazzola *et al.*, 1995b). Ceci implique différents types d'interaction à la fois au niveau du sol, mais aussi *in planta* pouvant ou non contribuer à améliorer la lutte contre les pathogènes. Les taux de protection obtenus peuvent relever à la fois d'une action concertée des différentes bactéries constituant le mélange sur le pathogène et d'une stimulation de différents mécanismes de défense de la plante (De Boer *et al.*, 1999). La coexistence des deux mécanismes serait le garant d'une lutte biologique efficace dans les conditions du vignoble.

CHAPITRE 3

EFFETS DES BACTERIES SUR L'ACTIVITE
LIPOXYGENASE ET LA COMPOSITION EN
ACIDES GRAS DES FEUILLES DE VIGNE

CHAPITRE 3

Effets des bactéries sur l'activité lipoxygénase et la composition en acides gras des feuilles de vigne

1 Introduction

De nombreuses rhizobactéries ont la capacité d'induire une résistance systémique (ISR) chez la plante, ce qui engendre une protection contre un grand nombre d'agents pathogènes fongiques et bactériens (Hammerschmidt *et al.*, 2001 ; Ramamoorthy *et al.*, 2001 ; Compant *et al.*, 2005 ; Haas et Défago, 2005). L'ISR se traduit par une protection de l'ensemble des organes de la plante (Hoffland *et al.*, 1995 ; M'Piga *et al.*, 1997 ; Audenaert *et al.*, 2002 ; Meziane *et al.*, 2005), sans aucun contact obligatoire entre les bactéries et le pathogène (Hoffland *et al.*, 1995 ; Pieterse *et al.*, 1996 ; Van Loon *et al.*, 1998). Cette ISR est souvent dépendante des populations bactériennes avec des concentrations seuils conduisant à une protection maximale (Raaijmakers *et al.*, 1995 ; Strigul et Kravchenko, 2006).

De nombreuses études ont montré que l'ISR est associée à l'induction des réactions de défense de la plante, qui seraient différentes de celles induites lors de la SAR (résistance systémique acquise). La SAR se trouve dépendante de l'accumulation du SA (Pieterse *et al.*, 1996) alors que l'ISR serait dépendante de la voie de JA et de celle de l'éthylène (Pieterse *et al.*, 1998 ; Knoester *et al.*, 1999). Certaines études suggéreraient que l'ISR serait associée à une augmentation de la sensibilité de la plante à ces hormones plutôt qu'à leur accumulation (Knoester *et al.*, 1999 ; Van Wees *et al.*, 1999 ; Pieterse *et al.*, 2000 ; 2002). De plus, l'induction de l'ISR chez le mutant d'*Arabidopsis jar1* (insensible au JA) par l'éthylène, suppose une activation séquentielle de la voie du JA d'abord puis celle de l'éthylène (Pieterse *et al.*, 1998). Le JA jouerait donc un rôle important dans les étapes de signalisation conduisant à la mise en place de l'ISR (Van Wees *et al.*, 1999 ; Pieterse *et al.*, 2000). Ce composé, ainsi que son dérivé méthylé (MeJA) appartiennent à la famille des oxylipines dérivés de la voie des lipoxygénases (LOX).

Les LOX catalysent la dégradation des acides gras polyinsaturés, via une dioxygénation du motif 1,4-*cis,cis*-pentadiène et conduisent ainsi à la formation d'hydropéroxydes d'acides

gras (Siedow, 1991 ; Grechkin, 1998). Ces composés considérés réactifs sont rapidement métabolisés et conduisent à leur tour à la synthèse de nombreuses molécules y compris le JA, le MeJA ou l'acide traumatique (Blée, 2002). Certains hydroperoxydes dérivant de l'acide linoléique (C18:2) ont une activité antimicrobienne et sont impliqués dans la résistance des plantes contre différents pathogènes (Ohta *et al.*, 1991, Sailaja *et al.*, 1997, Ongena *et al.*, 2004). Les LOX comportent différentes isoformes : la 9-LOX dont la dioxygénation s'effectue sur le carbone 9 et la 13-LOX dont la réaction se fait sur le carbone 13 (Grechkin, 1998). Le plus souvent, c'est la 9-LOX qui serait surexprimée ou impliquée dans les mécanismes de défense de la plante. Il a d'ailleurs été démontré que des tabacs transgéniques incapables d'exprimer le 9-LOX sont plus sensibles à l'infection par *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* (Rancé *et al.*, 1998). A l'inverse, d'autres plants de tabacs transformés deviennent résistants vis-à-vis du même champignon, lorsqu'un gène de la LOX y est surexprimé (Mène-Saffrané *et al.*, 2003). L'expression des gènes et l'activité de la LOX sont stimulées en réponse à différents stress biotiques et abiotiques, mais aussi par des éliciteurs de différentes natures et des phytohormones, tel que le JA et le MeJA (Melan *et al.*, 1993 ; Royo *et al.*, 1996 ; Véronési *et al.*, 1996 ; Bohland *et al.*, 1997 ; Heitz *et al.*, 1997 ; Vörös *et al.*, 1998 ; Fidantsef *et al.*, 1999 ; Maccarone *et al.*, 2000). Ces travaux suggèrent que l'activité LOX joue un rôle essentiel dans l'établissement de la résistance chez les plantes.

Chez la vigne, l'expression de gène codant pour une 9-LOX a également été mise en évidence lors de contamination par *B. cinerea* (Bézier *et al.*, 2002) ou *P. viticola* (Hamiduzzaman, 2005b). Des applications exogènes d'éliciteurs oligosaccharidiques (laminarine), protéique (polygalacturonase BcPG1) ou encore de BHT se traduisent aussi par l'expression du gène de la 9-LOX (Aziz *et al.*, 2003 ; Hamiduzzaman, 2005b ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005a). L'activité LOX est également stimulée chez les feuilles de vitoplants de vigne traitées avec du chitosan (Trotel-Aziz *et al.* 2006).

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), en particulier l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linoléique (C18:3), sont les substrats privilégiés des LOX. Chez de nombreuses plantes, il est bien établi que la composition en acide gras des feuilles varie lors d'attaques fongiques ou suite à des blessures (Conconi *et al.*, 1996 ; Koussa *et al.*, 1998 ; Ryu et Wang, 1998). L'application exogène de certains de ces acides gras, en particulier les AGPI, conduit à l'expression de diverses réponses de défense chez les plantes (Farmer et Ryan, 1992 ; Castoria *et al.*, 1995 ; Ellard-Ivey et Douglas, 1996 ; Véronési *et al.*, 1996). De même, des mutants d'*A. thaliana* déficients en acides gras polyinsaturés (McConn *et al.*, 1997) ou

incapables de convertir l'acide linoléique en jasmonates (Howe *et al.*, 1996) sont plus sensibles aux attaques d'insectes. Ces travaux rendent compte de l'importance des acides gras dans l'acquisition de la résistance aux pathogènes. Plusieurs études ont également montré l'importance de l'acide hexadécatriénoïque (C16:3) et de l'acide oléique (C18:1) dans la génération d'oxylipines, engagées ensuite dans la production de composés à activités antimicrobiennes. L'augmentation de la teneur en acide gras C16 :1, C16 :3 et C18 :1 chez la tomate et l'aubergine surexprimant un gène Δ -9-desaturase de levure est associée à une résistance accrue aux attaques d'*Erysiphe polygoni* et de *Verticillium dahliae* (Wang *et al.*, 1998 ; Xing et Chin, 2000).

L'activité LOX et la synthèse de dérivés hydroperoxydes antimicrobiens sont observés chez l'arachide, le haricot ou la tomate en réponse à l'application de diverses rhizobactéries non-pathogènes, telles que *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas putida* (Sailaja *et al.*, 1997 ; Ongena *et al.*, 2004 ; Silva *et al.*, 2004). Chez les cellules de tomate, la voie des LOX est activée chez des cultivars devenus résistants en réponse à l'application de souches *B. subtilis* surproduisant des lipopeptides (Ongena *et al.*, 2007).

L'objectif de ce chapitre est (1) d'étudier les effets des bactéries au niveau de l'activité LOX chez les feuilles de vitroplants en relation avec la concentration bactérienne dans le milieu, (2) d'évaluer les effets de ces bactéries sur la composition et la teneur en acides gras totaux et libres, (3) d'établir une relation entre les réactions de défense induites (LOX, acides gras), la concentration bactérienne dans les tissus foliaires et la protection contre *B. cinerea*.

2 Résultats

2.1 Activité de la lipoxygénase dans les tissus foliaires de vigne

L'activité LOX est mesurée dans les feuilles détachées de vitroplants puis incubées en présence de différentes concentrations (1×10^2 à 1×10^8 UFC ml⁻¹) de *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF2 ou *P. fluorescens* PTA-CT2. L'excision des feuilles incubées dans le milieu témoin n'induit pas d'activité LOX (Figure 1). Aussi, en présence des trois souches bactériennes à des concentrations de 1×10^2 UFC ml⁻¹, l'activité LOX reste similaire à celle du témoin (Figures 1 A, B et C). A partir d'une concentration bactérienne de 1×10^4 UFC ml⁻¹ l'activité LOX est stimulée (Figures 1 A, B et C). En présence de *B. subtilis* à des

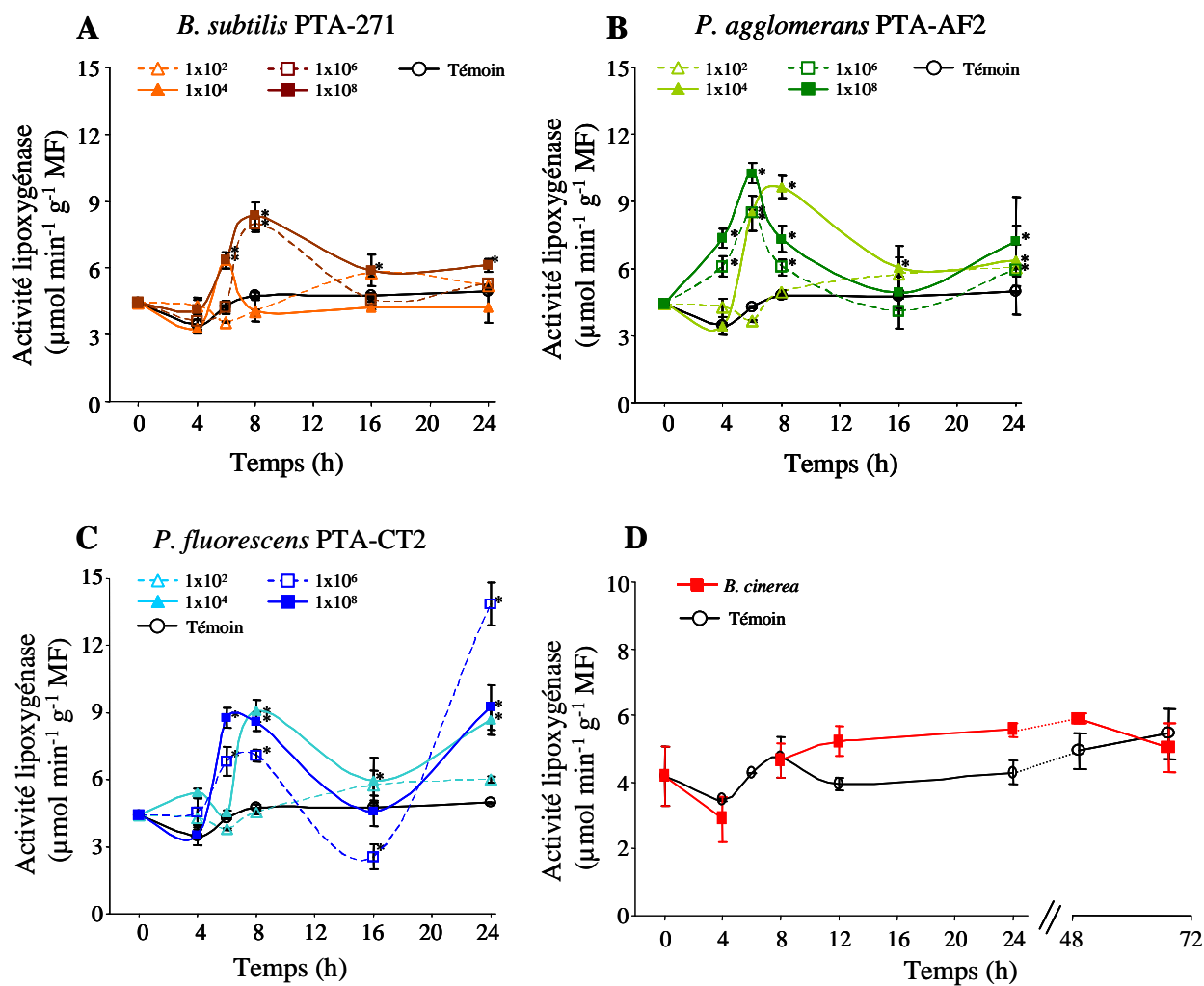


Figure 1 : Activité lipoxygénase des feuilles de vigne en réponse aux bactéries issues du vignoble (A,B,C) ou suite à l'inoculation par *B. cinerea* (D). Les feuilles sont excisées à partir de vitroplants (9 semaines) et mises en incubation en présence de *B. subtilis* PTA-271, de *P. agglomerans* PTA-AF2 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 à des concentrations de 10² UFC ml⁻¹, 10⁴ UFC ml⁻¹, 10⁶ UFC ml⁻¹ et 10⁸ UFC ml⁻¹, ou sans bactéries (témoin). Les feuilles de vitroplants sont inoculées avec des conidies de *B. cinerea* à 1x10⁵ spores ml⁻¹. L'activité lipoxygénase est déterminée en fonction de la durée d'incubation. Les valeurs représentent les moyennes (n=3) et l'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin, d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

concentrations de 1×10^6 et 1×10^8 UFC ml^{-1} , les niveaux d'activités obtenus sont deux fois plus importants que ceux obtenus à 1×10^4 UFC ml^{-1} (Figure 1 A). Dans le cas de *P. agglomerans* PTA-AF2 et de *P. fluorescens* PTA-CT2, l'activité LOX est plus précoce à 1×10^6 et 1×10^8 UFC ml^{-1} par rapport à celle obtenue en présence de 1×10^4 UFC ml^{-1} (Figure 1 B et C). En effet, des pics d'activité sont atteints dès 6 heures d'incubation des feuilles en présence des fortes concentrations en bactéries. L'incubation des feuilles en présence de la souche *P. fluorescens* PTA-CT2 à 1×10^4 , 1×10^6 et 1×10^8 UFC ml^{-1} , provoque également une nouvelle augmentation significative de l'activité LOX après 24 heures (Figure 1 C).

Les résultats montrent qu'une concentration bactérienne minimale de 1×10^4 UFC ml^{-1} semble nécessaire pour déclencher l'activité LOX dans les tissus foliaires de vigne. Au-delà de cette concentration, l'activité LOX reste relativement inchangée.

L'activité LOX est également suivie dans les tissus foliaires de vigne suite à l'infection par *B. cinerea* (Figure 1 D). Les résultats montrent que *B. cinerea* ne provoque pas d'activation significative de LOX. Le niveau d'activité LOX reste similaire à celui du témoin pendant les 72 heures de contamination.

Ces résultats suggèrent que les mécanismes impliqués dans la reconnaissance et les voies de transduction des signaux chez la vigne en réponse aux rhizobactéries seraient différents de ceux mis en œuvre lors de l'interaction avec l'agent pathogène *B. cinerea*.

2.2 Composition en acides gras des tissus foliaires de vigne

Les analyses par chromatographie en phase gazeuse ont permis de détecter et de quantifier différents acides gras saturés (C16:0, C8:0) et insaturés (C16:1, C16:2, C18:1, C18:2, C18:3) dans les tissus foliaires de vigne (Figure 2).

2.2.1 Acides gras totaux

Les acides gras totaux retrouvés dans les feuilles de vitroplants de vigne sont représentés par ordre d'importance décroissant : l'acide linoléique (C18:3), l'acide palmitique (C16:0), l'acide linoléique (C18:2), l'acide palmitoléique (C16:1) qui représentent à eux quatre environ 93 % des acides gras totaux. D'autres acides, tels que l'acide palmitoléique (C16 :2), l'acide stéarique (C18:0) et l'acide oléique (C18:1), sont également présents à des niveaux relativement faibles.

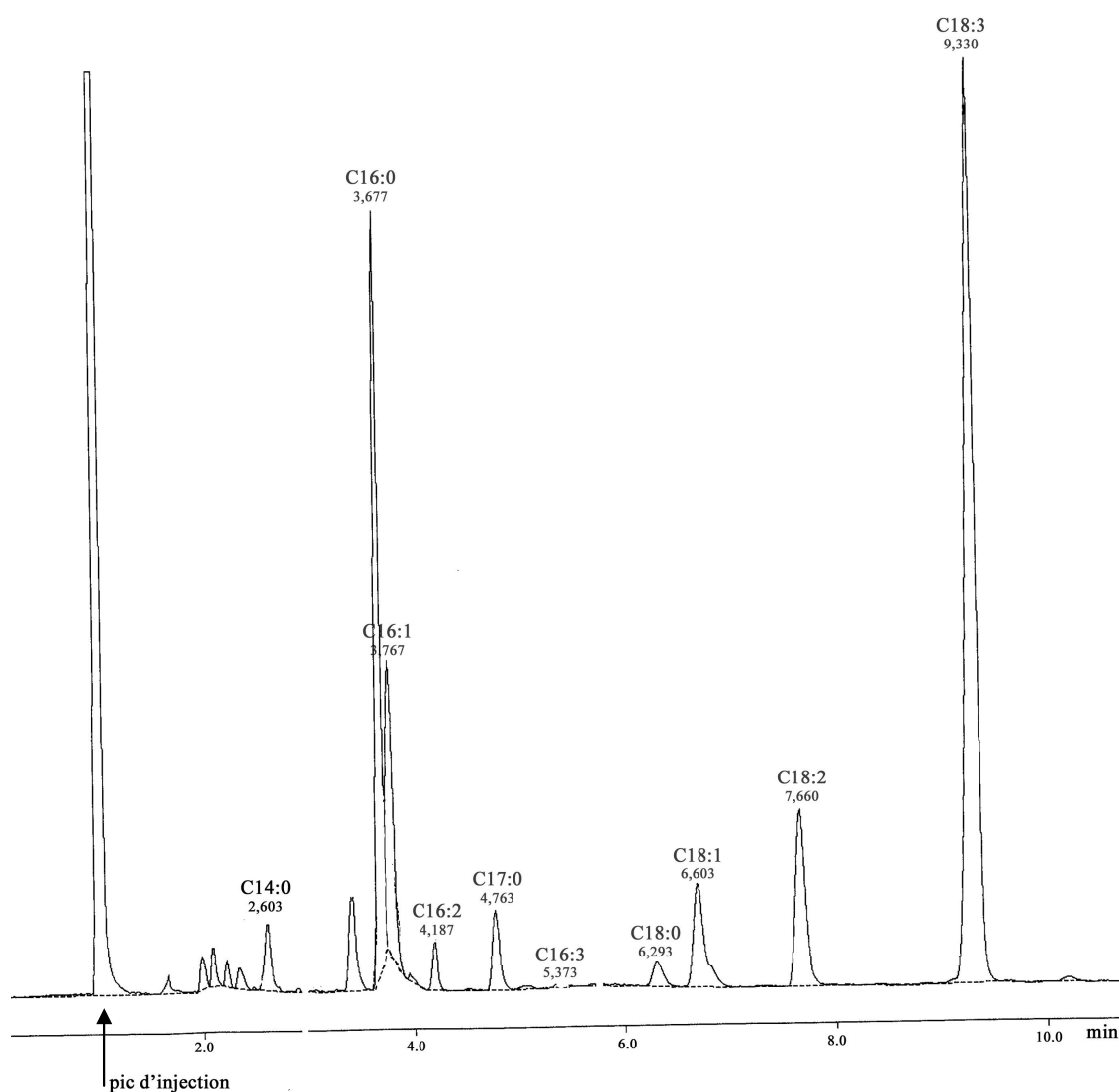


Figure 2 : Chromatogramme des acides gras totaux méthylés de feuilles de vitroplants de vigne témoin.

C14:0, acide myristique ; C16:0, acide palmitique ; C16:1, acide palmitoléique ; C16:2, acide palmitoléique ; C16:3, acide hiragonique ; C17:0, acide heptadécanoïque (standard interne) ; C18:0, acide stéarique ; C18:1, acide oléique ; C18:2, acide linoléique ; et C18:3, acide linoléique.

L'incubation des feuilles dans un milieu de référence (témoin) sous lumière continue se traduit par une légère augmentation de la teneur en certains acides gras totaux (Figure 3), en particulier le C16:0 après 24 h d'incubation (Figure 3 A). En présence de *B. subtilis* PTA-271, la teneur en C16:0 augmente après 4h de traitement puis diminue après 24 h par comparaison au témoin. Cette tendance est également observée en réponse à *P. agglomerans* PTA-AF2 et *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 3 A). Les teneurs en C16:1 restent similaires entre les témoins et les feuilles bactérisées tout au long de l'expérience (24 h) (Figure 3 B). En ce qui concerne le C18:0, sa teneur augmente sensiblement en présence de *P. fluorescens* PTA-CT2 par comparaison au témoin (Figure 3 C). Cependant, une légère diminution de la teneur en C18:1 est observée durant les premières heures d'incubation des feuilles en présence de *B. subtilis* PTA-271 et de *P. agglomerans* PTA-AF2 (Figure 3 D). *P. fluorescens* PTA-CT2, quant à elle, ne provoque pas d'effet significatif sur la concentration en C18:1.

Les teneurs en acides gras polyinsaturés en C18, quant à eux, subissent en général une baisse en réponse aux bactéries. En effet, une légère diminution de la teneur en C18:2 est observée dans les feuilles incubées en présence de *P. agglomerans* PTA-AF2 après 4 et 24 h d'incubation. C'est également le cas après 24 h d'incubation des feuilles en présence de *B. subtilis* PTA-271 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 3 E). En ce qui concerne le C18:3, les résultats montrent que sa teneur diminue sensiblement dans les feuilles en réponse à *B. subtilis* PTA-271 après 4 h et à *P. agglomerans* PTA-AF2 après 12 h (Figure 3 F). Toutefois, on peut noter que les teneurs en C18:3 augmentent légèrement pendant les 4 premières heures dans les feuilles incubées en présence de *P. fluorescens* PTA-CT2.

L'évolution de la composition en acides gras totaux a également été suivie dans les feuilles au cours de 72 h de contamination par *B. cinerea* (Figure 4). Les résultats obtenus montrent qu'à la différence des bactéries, l'inoculation des feuilles de vitroplants par *B. cinerea* se traduit par une légère diminution des teneurs en acides gras insaturés C16:1 et C18:3 dès 24 h (Figures 4 B, F).

On note que les variations des teneurs en acides gras totaux des feuilles bactérisées concernent globalement les acides gras en C18.

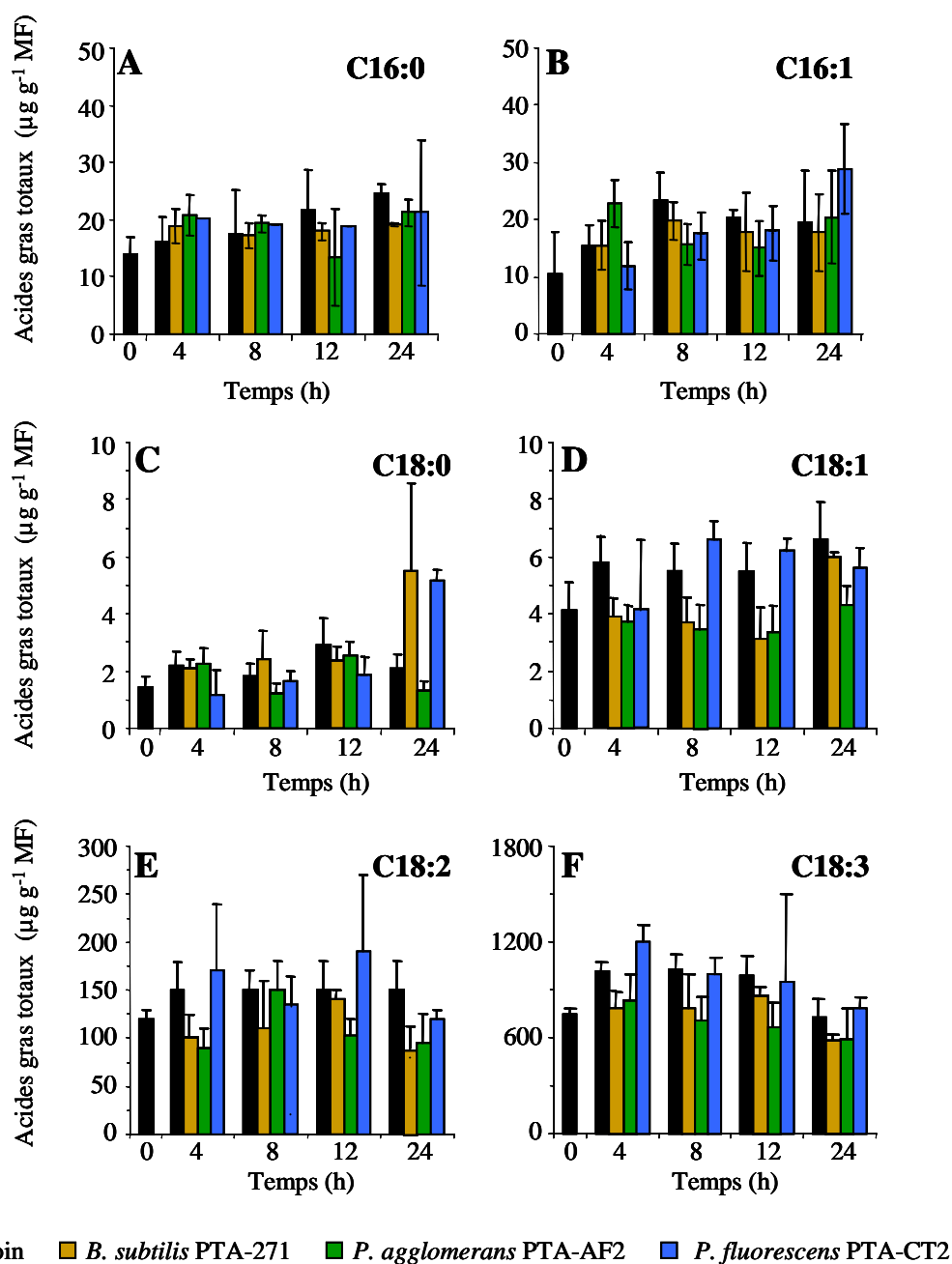


Figure 3 : Evolution des teneurs en acides gras totaux dans les tissus foliaires de vigne en réponse aux bactéries issues du vignoble. Les feuilles sont excisées à partir de vitroplants (9 semaines) et mises en incubation en présence de *B. subtilis* PTA-271, de *P. agglomerans* PTA-AF2 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 à une concentration de 1×10^6 UFC ml⁻¹ et du témoin. Les valeurs représentent la moyenne (10 feuilles en duplicatas) \pm l'écart à la moyenne. C16:0, acide palmitique (A) ; C16:1, acide palmitoléique (B) ; C18:0, acide stéarique (C) ; C18:1, acide oléique (D) ; C18:2, acide linoléique (E) et C18:3, acide linoléique (F).

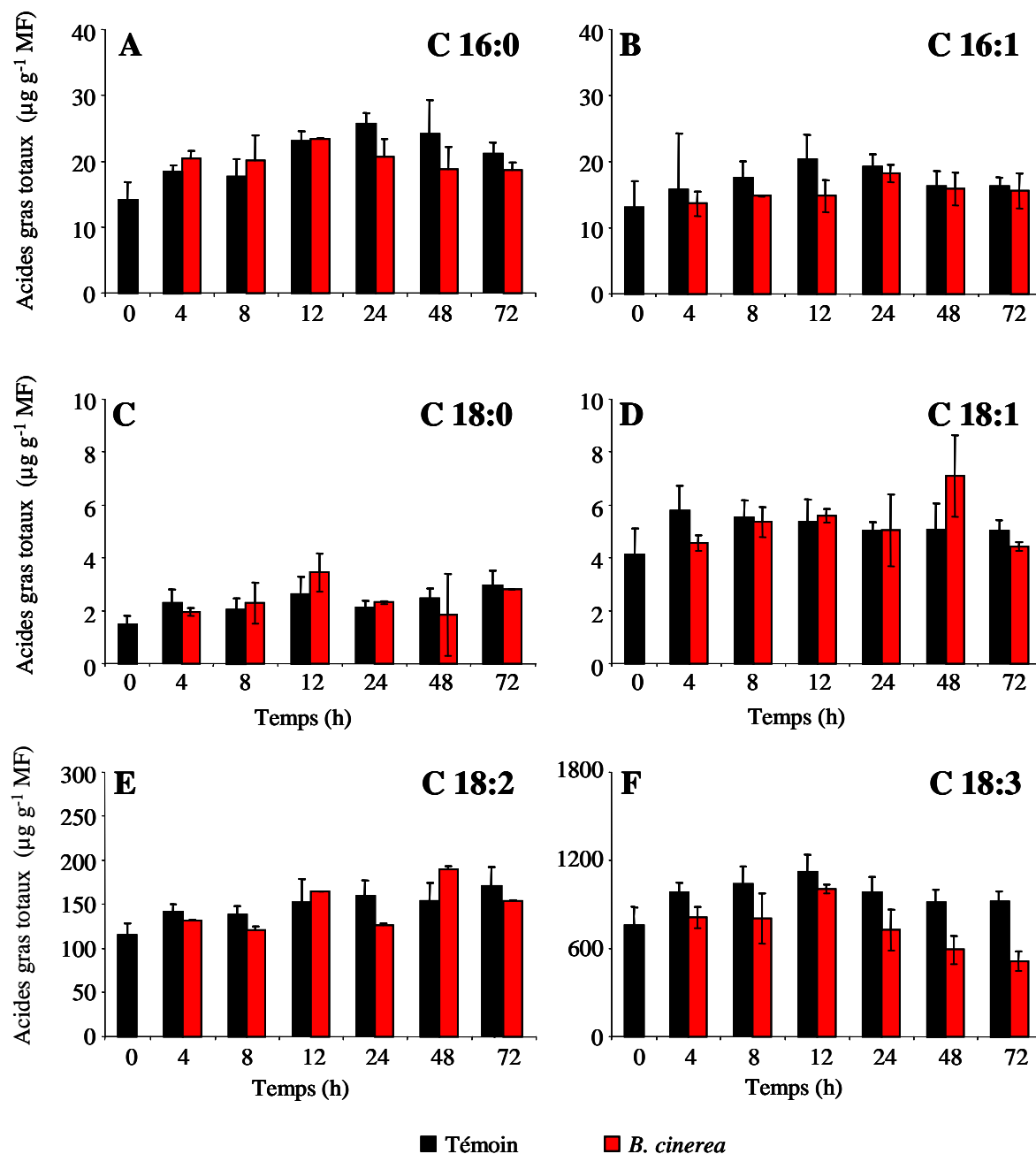


Figure 4 : Evolution des teneurs en acides gras totaux dans les feuilles de vigne inoculées par *B. cinerea*. Les feuilles de vitroplants sont inoculées par des conidies de *B. cinerea* à 1×10^5 spores ml^{-1} . Les valeurs représentent la moyenne ($n=2$) \pm l'écart à la moyenne. C16:0, acide palmitique (A) ; C16:1, acide palmitoléique (B) ; C18:0, acide stéarique (C) ; C18:1, acide oléique (D) ; C18:2, acide linoléique (E) et C18:3, acide linoléique (F).

2.2.2 Acides gras libres

Les acides gras libres représentent un substrat privilégié pour les LOX. Dans notre étude, les teneurs en acides gras libres sont déterminées dans les feuilles de vitroplants incubées en présence de *B. subtilis* PTA-271, de *P. agglomerans* PTA-AF2 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 à une concentration de 1×10^6 UFC ml⁻¹.

Chez le témoin, les teneurs en acides gras libres restent inchangés ou diminuent légèrement au cours du temps (Figure 5). L'incubation des feuilles en présence des bactéries se traduit, quant à elle, par une augmentation de la teneur en acides gras libres (Figure 5). Le niveau de cette augmentation varie selon la souche bactérienne. La figure 5 A montre que les teneurs en C16:0 sont supérieures à celles du témoin après 8 et 24 h en présence de *P. fluorescens* PTA-CT2, mais pas en présence de deux autres bactéries (Figure 5A). En présence de *B. subtilis* PTA-271 et de *P. agglomerans* PTA-AF2, les teneurs en C16:1 augmentent de manière significative après 12 h d'incubation (Figure 5B). Une augmentation transitoire des teneurs en C18:0 est également observée en présence de *P. fluorescens* PTA-CT2 et de *P. agglomerans* PTA-AF2 après 4 h et 24 h d'incubation des feuilles, respectivement (Figure 5 C). Les deux souches provoquent aussi un accroissement de la teneur C18:1 libre après 24 h d'incubation (Figure 5 D).

En ce qui concerne le C18:2 libre, les résultats montrent que ses teneurs diminuent légèrement après 4h d'incubation en présence de *P. agglomerans* PTA-AF2, puis augmentent dans les feuilles en réponse aux trois bactéries après 24 heures d'incubation (Figure 5 E). Les trois souches conduisent aussi à une diminution transitoire des teneurs en C18:3 libre après 4h d'incubation, suivie d'une augmentation après 8 et 24 h. Cette augmentation est beaucoup plus prononcée en réponse à *P. agglomerans* PTA-AF2 et à *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 5 F).

On peut noter que la baisse transitoire en C18:3 libre suite à l'action des bactéries est corrélée à l'augmentation de l'activité LOX. A l'inverse, lorsque l'activité LOX diminue après 10 h d'incubation des feuilles en présence des bactéries, les teneurs en acides gras libres en C18:3 augmentent.

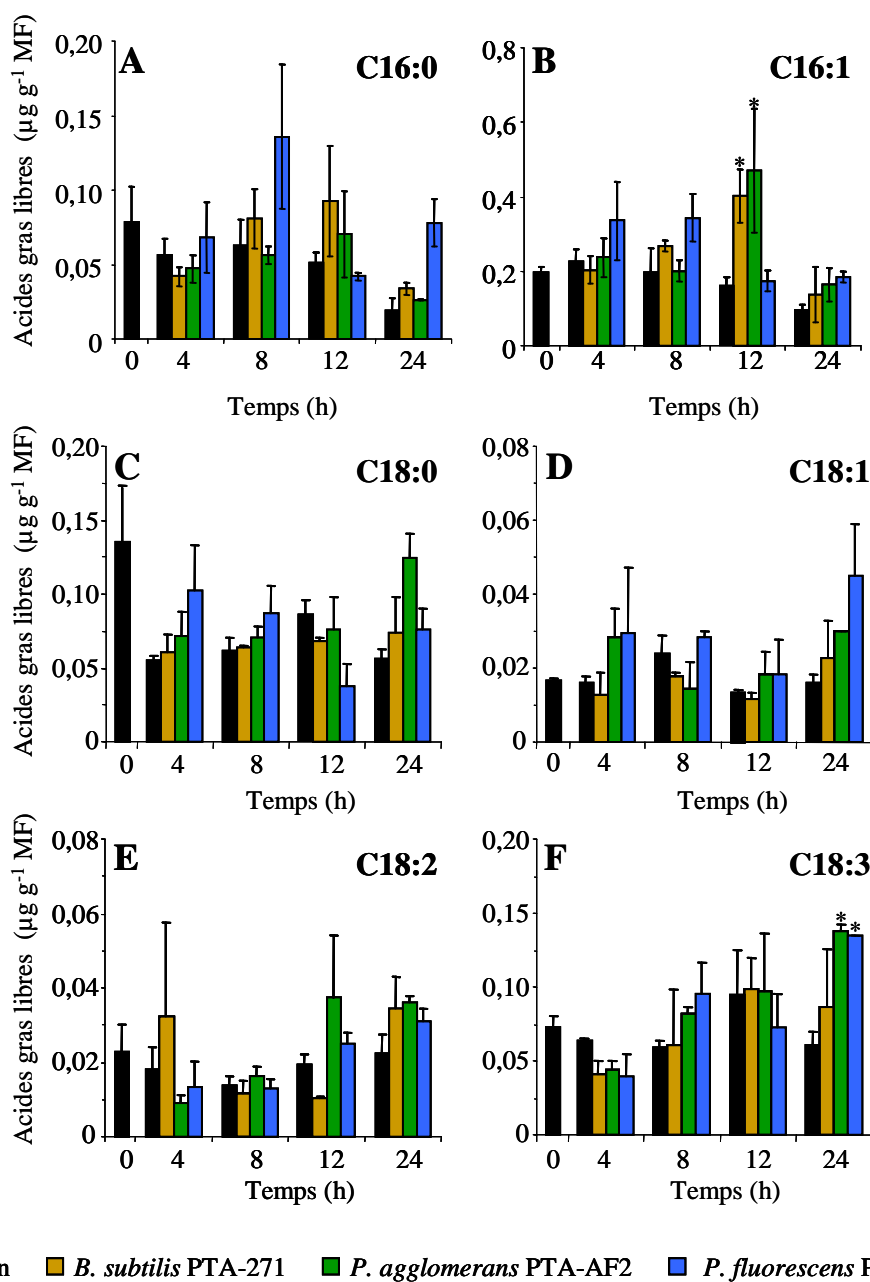


Figure 5 : Evolution des teneurs en acides gras libres dans les tissus foliaires de vigne en réponse aux bactéries issues du vignoble. Les feuilles sont excisées à partir de vitroplants (9 semaines) et mises en incubation en présence de chaque bactérie *B. subtilis* PTA-271, de *P. agglomerans* PTA-AF2 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 à une concentration de 10^6 UFC ml⁻¹ et du témoin. Les valeurs représentent la moyenne (10 feuilles en duplicatas) \pm l'écart à la moyenne. C16:0, acide palmitique (A) ; C16:1, acide palmitoléique (B) ; C18:0, acide stéarique (C) ; C18:1, acide oléique (D) ; C18:2, acide linoléique (E) et C18:3, acide linoléique (F). L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan.

2.3 Effet des concentrations bactériennes sur la protection des feuilles de vigne contre *B. cinerea*

Les feuilles détachées de vitoplants sont préalablement incubées pendant 16 heures en présence de *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF2 et *P. fluorescens* PTA-CT2 à différentes concentrations allant de 1×10^2 à 1×10^8 UFC ml⁻¹. A l'issue de cette pré-incubation, les feuilles sont soigneusement lavées puis inoculées avec une suspension conidienne de *B. cinerea*. La protection est estimée via la mesure de la taille de la nécrose après 7 jours de contamination.

Les résultats montrent qu'à une concentration bactérienne de 1×10^2 UFC ml⁻¹, *B. subtilis* PTA-271 et *P. agglomerans* PTA-AF2 ne procurent pas de protection significative contre *B. cinerea* (Figure 6A, 6B). On peut noter toutefois une légère protection en présence de *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 6C). A partir d'une concentration bactérienne de 1×10^4 UFC ml⁻¹, la nécrose provoquée par *B. cinerea* est fortement réduite quelle que soit la souche (Figure 6 A, B et C). Ce niveau de protection est quasi-similaire et atteint un maximum à des concentrations supérieures ou égales à 1×10^4 UFC ml⁻¹.

2.4 Colonisation des feuilles par les bactéries

Un suivi de la concentration bactérienne dans les tissus foliaires de vigne est réalisé afin d'établir une éventuelle relation entre l'amplitude des réactions induites (réactions de défense et protection contre *B. cinerea*) et la densité des bactéries dans les feuilles. Les résultats présentés dans la figure 7 A montrent l'évolution de la densité bactérienne dans les tissus foliaires en fonction de la concentration de *P. agglomerans* PTA-AF2 dans le milieu. On peut noter que plus la concentration de *P. agglomerans* PTA-AF2 dans le milieu augmente plus la concentration dans les feuilles est importante (Figure 7 A). Au bout de 24 h d'incubation, les concentrations du milieu et celles endogènes sont quasiment proportionnelles.

Des cinétiques d'accumulation des bactéries dans les feuilles ont aussi été réalisées en présence des trois souches *P. agglomerans* PTA-AF2 (Figure 7 B), *B. subtilis* PTA-271 (Figure 7 C) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (Figure 7 D) à une concentration de 1×10^6 UFC ml⁻¹. Dans tous les cas, on note une colonisation rapide des tissus foliaires par les bactéries. Cette

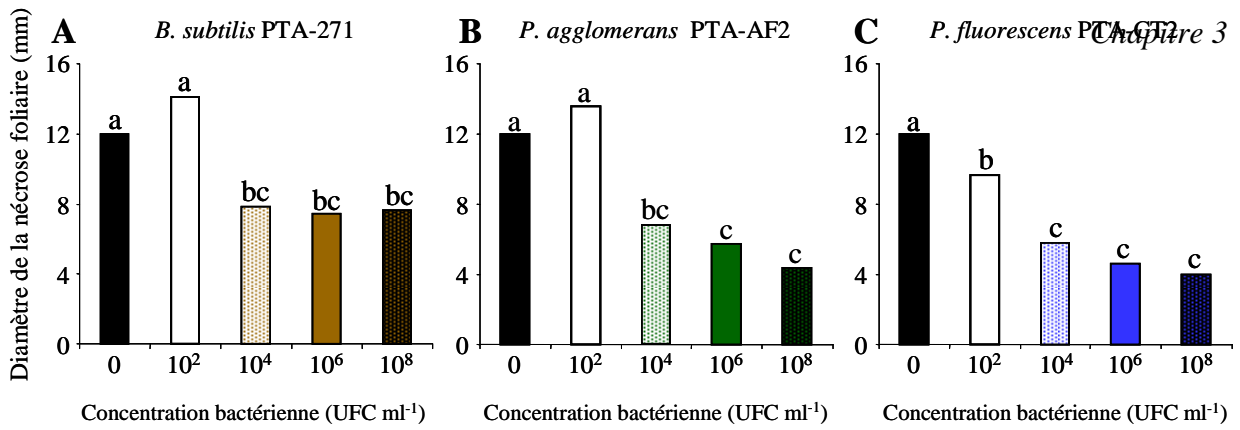


Figure 6 : Effet des bactéries issues du vignoble sur le développement de la nécrose foliaire causée par *B. cinerea*. Les feuilles de vitoplants sont préalablement incubées en présence de *B. subtilis* PTA-271 (A), *P. agglomerans* PTA-AF2 (B) et *P. fluorescens* PTA-CT2 (C) à différentes concentrations pendant 16 heures. Les feuilles sont ensuite rincées puis inoculées avec une suspension conidienne de *B. cinerea* à 1×10^5 spores ml⁻¹. La contamination des feuilles (diamètre de la nécrose) est déterminée 7 jours post-inoculation. Les valeurs représentent la moyenne (n=20) et les valeurs des histogrammes présentant la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test Newman-Keuls ($p < 0,05$).

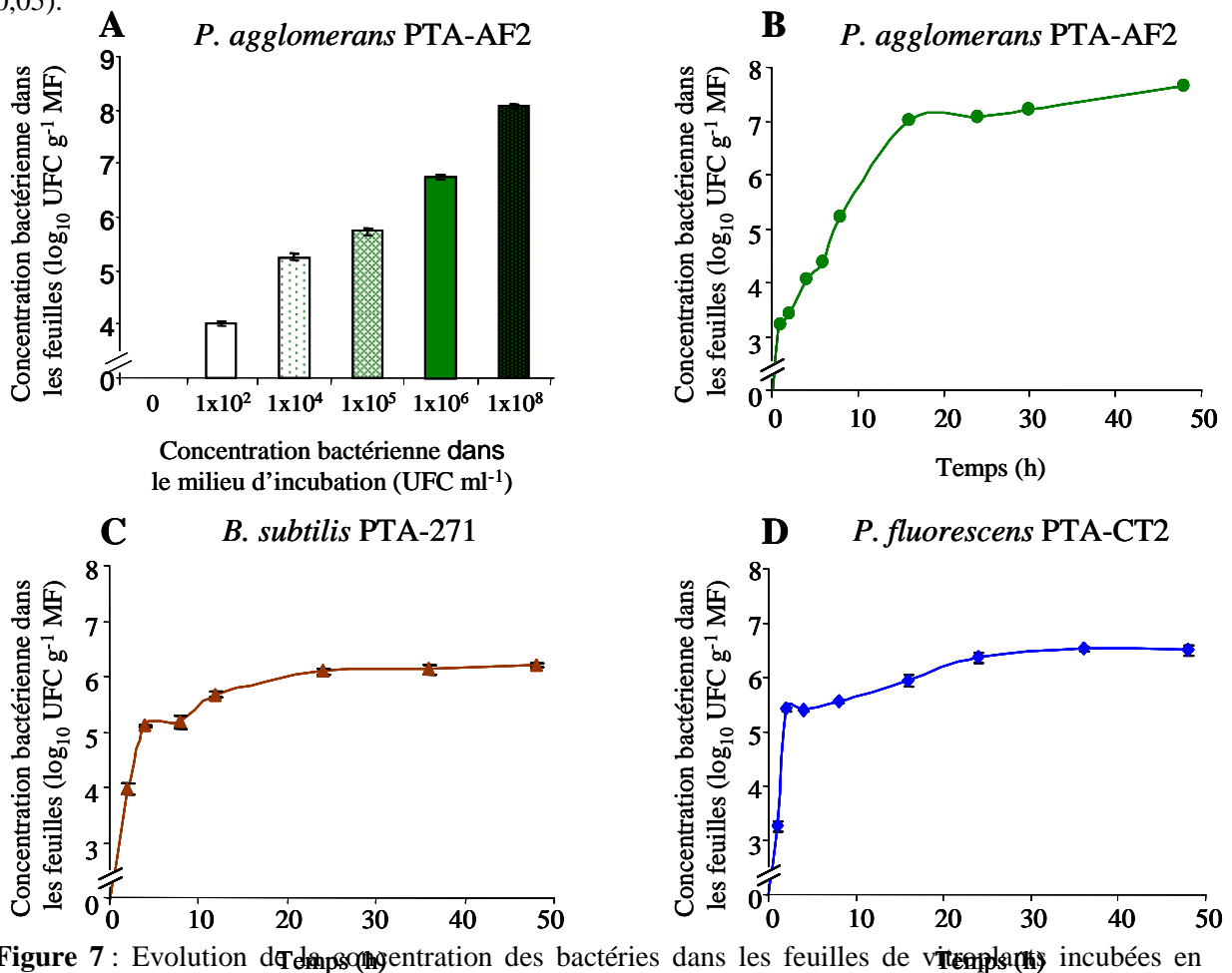


Figure 7 : Evolution de la concentration des bactéries dans les feuilles de vitoplants incubées en présence de *P. agglomerans* PTA-AF2, *B. subtilis* PTA-271 et *P. fluorescens* PTA-CT2. Concentration des bactéries dans les feuilles incubées en présence de *P. agglomerans* PTA-AF2 à différentes concentrations pendant 24 heures (A) ; cinétique d'accumulation des bactéries dans les feuilles incubées en présence de *P. agglomerans* PTA-AF2 (B), de *B. subtilis* PTA-271 (C) et de *P. fluorescens* PTA-CT2 (D) à 10^6 UFC ml⁻¹. Les valeurs représentent les moyennes de triplicatas \pm l'écart à la moyenne.

colonisation est exponentielle durant les premières heures d'incubation. L'accumulation de *B. subtilis* PTA-271 et de *P. fluorescens* PTA-CT2 semble plus précoce par rapport à *P. agglomerans* PTA-AF2. La densité des bactéries dans les feuilles atteint donc un maximum après 10 heures d'incubation, en particulier en présence de *B. subtilis* PTA-271 et de *P. fluorescens* PTA-CT2. En présence de *P. agglomerans* PTA-AF2, une forte concentration dans les feuilles est atteinte après 16 heures d'incubation.

3 Discussion

Dans cette étude, les expériences ont été réalisées sur des feuilles isolées de vitroplants et incubées en présence de trois bactéries : *B. subtilis* PTA-271, *P. agglomerans* PTA-AF2 et *P. fluorescens* PTA-CT2, dans des conditions contrôlées. Les résultats obtenus montrent que les bactéries issues du vignoble sont capables d'induire la voie des octadécanoïdes dans les tissus foliaires de vigne, matérialisée par une activation transitoire de la LOX et une modification des teneurs en acides gras. Ces réactions sont dans la plupart des cas corrélées à une accumulation des bactéries dans les tissus foliaires et à une protection contre *B. cinerea*.

La détermination de l'activité LOX montre que cette réaction semble modulée de manière similaire par les trois souches bactériennes, en l'absence d'inoculation par *B. cinerea*. Ces résultats sont en conformité avec ceux de Sailaja *et al.* (1997) et d'Ongena *et al.* (2004), qui montrent que la LOX est stimulée suite à l'application de *B. subtilis* et de *Pseudomonas putida* chez les plantules d'arachides et les feuilles d'haricot. Toutefois, et quelle que soit la bactérie, cette activité LOX nécessite une concentration bactérienne minimale (1×10^4 UFC ml⁻¹), au-delà de laquelle cette activité atteint un niveau maximal. Les fortes concentrations en bactérie (1×10^6 et 1×10^8 UFC ml⁻¹) conduisent à une stimulation précoce de la LOX. Ces résultats suggèrent que la régulation de la voie des LOX serait dépendante de la densité des populations bactériennes. Ceci peut résulter du mécanisme de régulation bactérien "quorum sensing". Ce mécanisme serait responsable de la synchronisation de l'expression de signaux au sein d'une population bactérienne en fonction de sa concentration. Les bactéries qui utilisent ce mécanisme produisent des molécules signales dites autoinductrices, à l'image des N-acyl homosérine lactone (AHL), qui à forte concentration peuvent contribuer à contrôler l'expression de différents gènes (Pierson *et al.*, 1998b). Ainsi les AHL régulent par exemple, la production de phénazine (antibiotique) et de rhamnolipides, connus pour jouer un rôle dans la lutte contre les pathogènes par des

Pseudomonas (Pierson et Pierson, 1996, Pierson *et al.*, 1998b). Les déterminants bactériens susceptibles de stimuler l'activité LOX pourraient être soumis à un même mode de régulation, entraînant leur production puis leur perception par la plante uniquement lorsqu'un seuil de densité des populations bactériennes est atteint.

Dans cette étude, il apparaît aussi que l'activité LOX n'est pas stimulée par *B. cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne. Ce résultat suggère que les mécanismes impliqués dans la perception et la transduction des signaux des bactéries par la vigne seraient différents de ceux mis en œuvre au cours de l'interaction vigne-*B. cinerea*. Néanmoins, il a été montré par Bézier *et al.* (2002) que l'inoculation des feuilles par *B. cinerea* conduisait à l'expression tardive d'un gène codant pour une 9-LOX. Ceci suggère que la régulation de la voie de LOX chez les feuilles de vigne serait post-transcriptionnelle et diffère entre les microorganismes pathogènes et non-pathogènes.

L'évolution de l'activité LOX en réponse aux bactéries du vignoble semble un caractère important à prendre en considération quand il s'agit de prédire l'induction de la résistance chez la vigne. Des travaux mettant en jeu des plantes transgéniques (surexpression ou anti-sens du gène LOX) ont montré que les LOX, en particulier la 9-LOX, sont impliquées dans la mise en place de la résistance des plantes aux pathogènes fongiques (Rancé *et al.*, 1998 ; Mène-Saffrané *et al.*, 2003). Cette réaction est également associée à la réaction d'hypersensibilité au cours de laquelle l'activation de la voie des LOX conduit à la génération d'hydroperoxydes et de radicaux libres impliqués dans les phénomènes de mort cellulaire (Montillet *et al.*, 2002). Néanmoins, dans notre étude aucune nécrose des tissus foliaires ni symptôme typique de la réaction HR n'ont été observés chez les feuilles de vigne incubées en présence des différentes bactéries.

Il apparaît que l'activité LOX induite par les rhizobactéries dans les feuilles de vigne est accompagnée d'une modification de la composition en acides gras totaux et libres, en particulier d'une perte précoce d'acides gras polyinsaturés libres. La rapide augmentation de l'activité LOX observée et la diminution des teneurs en C18:3 dans les tissus foliaires bactérisés pourraient témoigner de leur implication dans la perception des signaux d'origine bactérienne et leur transduction au niveau cellulaire. La modification des teneurs en acides gras libres est souvent impliquée dans les événements précoces de signalisation *via* leur rôle comme substrat de la LOX, nécessaire à la synthèse d'oxylipines (Ryu et Wang, 1998). Certaines oxylipines peuvent avoir des propriétés antifongiques (Vaughn et Gardner, 1993 ; Ricker et Bostock, 1994 ; Weber *et al.*, 1999) ou antibactériennes (Croft *et al.*, 1993). Des

dérivés de la voie de la LOX, en particulier des produits volatils, ont été mis en évidence dans les baies de vigne suite à des blessures (Nijssen *et al.*, 1996). Certains de ces composés, tels que des aldéhydes en C6 et en C9, inhibent aussi le développement de *B. cinerea* (Archbold *et al.*, 1997 ; Fallik *et al.*, 1998 ; Ongena *et al.*, 2004 ; Matsui *et al.*, 2006).

L'acide linoléique (C18:3) est un précurseur important de la synthèse du JA et du MeJA, considérés comme signaux impliqués dans la régulation des réactions de défense de la plante (Conconi *et al.*, 1996). L'implication du JA dans l'ISR a été mise en évidence dans plusieurs modèles végétaux en réponse à des rhizobactéries (Pieterse *et al.*, 2000 ; Ryu *et al.*, 2003 ; Domenech *et al.*, 2007). Des transformants d'*Arabidopsis*, capables d'accumuler du MeJA à des niveaux importants expriment une forte résistance contre *B. cinerea* (Seo *et al.*, 2001).

L'activation de la voie des LOX dans les feuilles de vigne incubées en présence de *B. subtilis* PTA-271, de *P. agglomerans* PTA-AF2 et de *P. fluorescens* PTA-CT2, est également associée à une protection accrue contre *B. cinerea*. Cette protection n'est obtenue qu'à partir d'une concentration bactérienne supérieure ou égale à 1×10^4 UFC ml⁻¹, au-delà de laquelle le niveau de protection reste statistiquement similaire. Des résultats comparables ont également été rapporté par Raaijmakers et ses collaborateurs, montrant que l'application d'une rhizobactérie *Pseudomonas fluorescens* à une concentration comprise entre 1×10^5 et 1×10^6 UFC g⁻¹ de sol est nécessaire pour conférer une protection du radis contre *Fusarium oxysporum* (Raaijmakers *et al.*, 1995) ou du blé contre *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Raaijmakers et Weller, 1998). Cette protection est apparemment liée à l'induction des mécanismes de défense de la plante, mais il n'est pas exclu que des mécanismes d'antagonisme direct peuvent avoir lieu entre les deux microorganismes. Dans cette étude, seule *P. fluorescens* PTA-CT2 se montre capable à la fois d'induire des réactions de défense de la vigne et de bloquer directement la croissance de *B. cinerea in vitro* (Trotel-Aziz *et al.*, 2007).

Il apparaît que l'incubation des feuilles de vigne en présence des bactéries se traduit par une colonisation des tissus par celles-ci à des niveaux proches de ceux présents dans le milieu d'incubation. La colonisation des tissus foliaires par les bactéries est d'autant plus nette que la concentration bactérienne dans le milieu d'incubation est importante. Cette colonisation est variable selon la souche et atteint un niveau maximal après 8 ou 16 heures de mise en contact avec les feuilles. Les différences observées en terme de colonisation des feuilles par les trois souches bactériennes peuvent relever de caractère physiologique propre à chaque souche et donc de son aptitude à coloniser les tissus de la plante (Kim *et al.*, 1997 ; Yan *et al.*, 2003).

Ce potentiel de colonisation des tissus peut contribuer à activer efficacement certains mécanismes de résistance de la plante ou encore interagir avec le pathogène lorsque la bactérie a un caractère antagoniste.

CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Jusqu'à présent la lutte contre *B. cinerea*, agent de la pourriture grise de la vigne, s'effectue principalement par l'utilisation de fongicides chimiques responsables d'une importante pollution de l'environnement et d'un déséquilibre écologique considérable. En outre, malgré le développement de nouveaux fongicides, le viticulteur se trouve confronté à l'émergence systématique de souches résistantes. Il est donc nécessaire de développer des alternatives à la seule lutte chimique pour une viticulture durable, plus respectueuse de l'environnement. Dans ce contexte, la lutte biologique contre les maladies cryptogamiques de la vigne à l'aide de rhizobactéries semble être une alternative prometteuse à l'emploi des fongicides, de part la présence de ces microorganismes dans les agro-systèmes, leur grande diversité et leur dissémination dans les sols rhizosphériques. Ainsi, le vignoble constituerait une réserve de microorganismes aux propriétés protectrices de la vigne particulièrement intéressantes.

Les études réalisées par notre groupe (Trotel-Aziz *et al.*, 2007), à la fois sur le terrain et au laboratoire, ont conduit à l'isolement et l'identification de différentes souches bactériennes issues des différents niveaux d'organisation de la vigne (racines, tiges, feuilles) et de la rhizosphère du vignoble champenois. Des tests réalisés dans des conditions *in vitro* ont permis de différencier certaines de ces souches ayant la capacité de protéger les feuilles de vigne contre *B. cinerea*. Il s'agit de deux souches d'*Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et PTA-152, d'une *Bacillus subtilis* PTA-271, de deux *Pantoea agglomerans* PTA-AF1 et PTA-AF2 et de deux *Pseudomonas fluorescens* PTA-268 et PTA-CT2. Les effets protecteurs observés semblent relever de la capacité de ces souches à induire quelques réactions de défense de la vigne et pour certaines souches à inhiber directement le développement du pathogène.

Dans cette étude, ces bactéries ont été appliquées au vignoble afin d'évaluer l'efficacité de chaque souche en culture pure ou sous forme de multiples combinaisons dans l'induction des différentes réactions de défense de la vigne (chitinase, β -1,3-glucanase, PAL) et de sa protection contre *B. cinerea*. L'action de ces bactéries sur certaines réactions précoces (LOX, acides gras) a également été étudiée dans des conditions *in vitro*. Les résultats présentés dans cette thèse indiquent qu'il est possible d'induire la résistance de la vigne à l'aide de rhizobactéries ou de combinaisons de bactéries et que la plante est capable de mobiliser sa

machinerie métabolique vers les voies de défense nécessaires pour lutter contre *B. cinerea*. La protection induite pourrait relever de mécanismes dépendant à la fois de la capacité de résistance de la plante, de l'expression des propriétés protectrices des bactéries locales, mais sans doute aussi des conditions du milieu. Au **vignoble**, le niveau de protection des feuilles et des baies contre *B. cinerea* semble dépendre de la souche bactérienne, de la combinaison de souche, de la méthode d'application et de la pression du pathogène. Quel que soit leur mode d'application, les souches les plus performantes en terme de protection des feuilles sont représentées par *P. agglomerans* PTA-AF1 et *P. fluorescens* PTA-CT2. Pour la plupart des bactéries étudiées, le mode d'application au sol se montre plus efficace par rapport à l'injection ou la pulvérisation de celles-ci. Les souches PTA-113 et PTA-CT2 induisent une réduction importante des attaques contre *B. cinerea* lorsque celles-ci sont appliquées au sol. Ceci suggère que les bactéries sont susceptibles d'induire une résistance systémique chez la vigne.

Dans les baies, c'est la souche *P. agglomerans* PTA-AF1 qui semble plus active en terme de protection contre *B. cinerea*, notamment en situation de faible infection. Toutefois une certaine hétérogénéité de protection contre *B. cinerea* existe à la fois dans les feuilles et dans les baies d'une année sur l'autre. Cette hétérogénéité peut résulter de différents facteurs affectant la pression parasitaire ou l'interaction avec la microflore locale, la capacité de colonisation de la rhizosphère ou de la phyllosphère par les agents de la lutte biologique ou encore de l'état physiologique de la plante.

L'application de différentes combinaisons de bactéries aboutit également à une certaine protection des feuilles et des baies contre *B. cinerea*. Les mélanges les plus actifs sont ceux constitués de deux *P. agglomerans* (AF1+AF2), de trois souches (*Bacillus*+*Pantoea*), de quatre souches (*Acinetobacter*+*Pantoea*, *Acinetobacter*+*Pseudomonas*) et de 5 souches (*Bacillus*+*Pantoea*+*Pseudomonas*). Néanmoins, les mélanges combinant les deux *A. lwoffii* (113+152), les deux *P. fluorescens* (268+CT2) ou le mélange *Acinetobacter*+*Bacillus*+*Pseudomonas* sont inefficaces contre *B. cinerea*. Ceci renvoie à l'hypothèse selon laquelle ces bactéries seraient en antagonisme entre elles ou avec d'autres microorganismes de la microflore locale. Cet antagonisme peut relever de mécanismes de compétition ou d'antibiose, conduisant à une diminution des activités des agents de lutte biologique. Ces résultats rendent compte du fait que les mélanges de bactéries ne sont pas systématiquement plus efficaces que les bactéries individuelles.

Une variabilité dans la protection des baies a été observée en 2004. Cette variabilité semble résulter des conditions environnementales stressantes, puisque l'estimation de la contamination des baies par *B. cinerea* a été réalisée en période de post-vendanges. Les essais réalisés en 2005 ont permis d'enregistrer une amélioration de la protection de la vigne (pouvant atteindre 80%) sans apport annuel des bactéries. Ces résultats viennent conforter l'hypothèse selon laquelle une réitération ou un maintien des bactéries dans le sol et / ou dans la plante est possible.

La protection contre *B. cinerea* en réponse à l'application de bactéries au vignoble est corrélée à une stimulation de certaines réactions de défense (activation de chitinase, β -1,3-glucanase, PAL). L'induction de ces réactions semble évidente en réponse à l'application des bactéries individuelles (*A. lwoffii* PTA-113 et PTA-152, *P. fluorescens* PTA-CT2), mais également suite à l'application de mélanges associant particulièrement les *Acinetobacter*, les *Pantoea* et les *Pseudomonas*.

Sur le plan spatio-temporel, les réactions induites et la protection sous-jacente nous indiquent que les bactéries étudiées sont capables d'induire une résistance systémique chez la vigne, notamment lorsque celles-ci sont appliquées au niveau du sol. L'activation des composantes de l'ISR pourrait être un élément clé de l'acquisition de la résistance de la vigne à différents pathogènes.

Les activités chitinase et β -1,3-glucanase en réponse aux bactéries pourraient témoigner d'une capacité significative de résistance de la vigne envers *B. cinerea*. Par ailleurs, la succession de ces réactions de défense dans les différents organes pourrait témoigner d'un « transfert de signaux » des feuilles vers les baies après la véraison. Ce transfert impliquerait des signaux affectant l'expression des protéines de défense ou encore le transport de protéines de défense elles-mêmes. Un tel transfert peut également contribuer à la mise en place d'un état d'ISR, en particulier lorsque les bactéries sont appliquées au sol.

Les expériences réalisées dans les **conditions contrôlées** montrent que le métabolisme des oxylipines est activé chez les feuilles de vitroplants de vigne en réponse à *B. subtilis* PTA-271, à *P. agglomerans* PTA-AF2 et à *P. fluorescens* PTA-CT2. Cette activation est matérialisée par une stimulation transitoire de l'activité LOX accompagnée d'une perte précoce en acides gras poly-insaturés libres, notamment en C18:3. L'augmentation tardive de la teneur en cet acide gras libre pourrait résulter d'une baisse de l'activité LOX et / ou d'une activation importante de phospholipases.

La stimulation de l'activité LOX est également associée à une protection des feuilles bactérisées contre *B. cinerea*. Ces réactions se montrent dépendantes de la concentration bactérienne dans le milieu mais aussi de la colonisation des feuilles par les bactéries. Dans la majorité des cas, une concentration bactérienne minimale de 1×10^4 UFC ml^{-1} est nécessaire à la mise en place de ces réactions induites, suggérant ainsi l'implication directe des bactéries « *in situ* » ou de leurs déterminants, qui seraient eux même régulés par « quorum sensing ».

Les travaux en cours ont également pour objectif d'élargir le succès de la lutte biologique, dans un contexte de lutte intégrée, à tous les vignobles en appellation Champagne. Différents prélèvements de sol et de plants de vignes ont été réalisés dans une parcelle viticole de l'Aube. 326 bactéries ont été isolées et sont représentatives de tous les milieux prospectés. Elles proviennent pour 35% du sol, pour 36% des racines et pour 29% des sarments (Annexe 3). Le criblage des bactéries a permis de sélectionner 29 souches conférant une protection de la vigne contre *B. cinerea*. L'analyse par des galeries API a permis d'identifier 13 espèces différentes dont 4 appartiennent au genre des *Pseudomonas* et 1 au genre des *Pantoea*, retrouvées également dans les parcelles situés dans la Marne (Annexe 4). La protection induite varie en fonction de la température et du cultivar (Annexe 5). Dans la majorité des cas une augmentation de la température entraîne une faible protection par les bactéries.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives parmi lesquelles :

(1) L'importance de l'ISR s'avère déterminante dans la protection contre *B. cinerea*. Afin de tirer profit de l'ISR et d'améliorer son efficacité, une meilleure connaissance des caractéristiques bactériennes impliquées dans l'induction des voies de défense de la vigne est nécessaire. Il s'agira notamment de rechercher quels sont les principaux déterminants bactériens susceptibles d'induire les réactions de défense de la vigne impliquées dans la protection de la plante contre *B. cinerea*.

(2) L'état physiologique et les conditions de culture des plantes jouent un rôle important dans le bon déroulement des phénomènes de résistance induite. Il s'agira donc de déterminer l'effet des différentes contraintes abiotiques sur le niveau de stimulation des réactions de défense de la plante au cours de son développement. Ces effets interviennent également sur la régularité de l'efficacité des agents de lutte biologique. Il serait donc judicieux d'étudier

l'effet des impacts environnementaux sur la capacité d'adaptation des bactéries (compétence écologique) et sur leur efficacité à induire une protection contre *B. cinerea*, relevant probablement de mécanismes de régulation impliquant le « quorum sensing ».

(3) Afin de mieux comprendre le rôle que peuvent avoir les chitinases et les β -1,3-glucanases dans la résistance de la vigne contre *B. cinerea*, il serait important de caractériser les différentes isoformes induites chez la vigne en réponse aux bactéries et d'identifier celles qui seraient impliquées dans la résistance de la plante au pathogène nécrotrophe. La stimulation de l'activité PAL chez la vigne en réponse aux bactéries pose la question de l'importance des composés secondaires de la voie des phénylpropanoïdes (phytoalexines stilbéniques, tanins, lignine) dans la protection de la vigne contre *B. cinerea*. La caractérisation de déterminants de l'ISR et leur implication dans la régulation de la voie des phénylpropanoïdes seront appréhendées.

(4) Au niveau de la voie des octadécanoïdes, il sera intéressant d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes déclenchés par l'application des bactéries non seulement en amont de l'activité LOX, telles que les phospholipases (A2, C ou D) qui sont impliquées dans de nombreux phénomènes d'élicitation (Chandra *et al.*, 1996, Laxalt *et al.*, 2001 ; Munnik *et al.*, 1998 ; Van der Luit *et al.*, 2000 ; Zhao *et al.*, 2004), mais aussi en aval, à l'image des activités lipide hydroperoxydase ou de l'hydroperoxyde lyase, connues pour conduire à l'accumulation de molécules antimicrobiennes (hydroperoxydes, Z-3-hexenal) (Sailaja *et al.*, 1997 ; Ongena *et al.*, 2004) ou molécules signales (JA, MeJA) (Croft *et al.*, 1993 ; Blée, 2002).

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Produits antifongiques, mais non anti-*botrytis*, appliqués sur les parcelles CR et NL au cours des années 2002, 2003, 2004 et 2005.

2002			2003		
Date	PRODUITS / substances actives	Usage	Date	PRODUITS / substances actives	Usage
16/05	PANTHEOS / diméthomorphe +folpel	PM	04/05	PANTHEOS / diméthomorphe +folpel	PM
25/05	PANTHEOS / diméthomorphe +folpel	PM	15/05	PANTHEOS / diméthomorphe +folpel LEGEND / quinoxyfen	PM EN
04/06	OLYMP 10 EW / flusilazole VAMIN / ofurace + folpel	GB, PZ, EN PM, PH	06/06	PANTHEOS / diméthomorphe +folpel SCORE / difénoconazole	PM GB, PZ, EN
14/06	MIKAL FLASH / foséthyl d'Al + folpel SCORE / difénoconazole	PM GB, PZ, EN	16/06	SCORE / difénoconazole SIRBEL / folpel+iprovalicarbe	GB, PZ, EN PM
27/06	LEGEND / quinoxyfen MIKAL FLASH / foséthyl d'Al + folpel	EN PM	24/06	LEGEND / quinoxyfen SIRBEL / folpel+iprovalicarbe	EN PM
04/07	VALIANT / folpel+foséthyl d'Al+cymoxanil	PM	29/07	SYGAN / cymoxanil +folpel	PM
08/07	LEGEND / quinoxyfen VALIANT / folpel+foséthyl d'Al+cymoxanil	EN PM	09/07	KARATHANE LC / Dinocap PANTHEOS / diméthomorphe +folpel	EN PM,
20/07	KARATHANE LC / Dinocap VALIANT / folpel+foséthyl d'Al+cymoxanil	EN PM	21/07	KARATHANE LC / Dinocap SYGAN / cymoxanil +folpel	EN PM
01/08	ANTÉOR FLO / cymoxanil +folpel	PM	31/07	SYGAN / cymoxanil +folpel	PM
12/08	ANTÉOR FLO / cymoxanil +folpel	PM			

2004			2005		
Date	PRODUITS / substances actives	Usage	Date	PRODUITS / substances actives	Usage
19/05	EPERON / mancozèbe	PM	02/05	SYGAN / cymoxanil +folpel	PM
28/05	SCORE / difénoconazole TAIREL F / béalaxyl+folpel	GB, PZ, EN PM, PH ; PZ	11/05	PANTHEOS / diméthomorphe +folpel	PM
06/06	SCORE / difénoconazole TAIREL F / béalaxyl+folpel	GB, PZ, EN PM, PH ; PZ	24/05	EPERON MIX / mancozèbe+méfénoxam LEGEND / quinoxyfen	PM EN
17/06	KARATHANE LC / Dinocap PANTHEOS / diméthomorphe +folpel	EN PM,	02/06	EPERON MIX / mancozèbe+méfénoxam LEGEND / quinoxyfen	PM EN
28/06	KARATHANE LC / Dinocap SIRBEL / folpel+iprovalicarbe	EN PM	14/06	SCORE / difénoconazole TAIREL F / béalaxyl+folpel	GB, PZ, EN PM, PH ; PZ
09/07	LEGEND / quinoxyfen SIRBEL / folpel+iprovalicarbe	EN PM	24/06	SCORE / difénoconazole TAIREL F / béalaxyl+folpel	GB, PZ, EN PM, PH ; PZ
17/07	SCORE / difénoconazole SYGAN / cymoxanil +folpel	GB, PZ, EN PM	06/07	LEGEND / quinoxyfen SIRBEL / folpel+iprovalicarbe	EN PM
28/07	SCORE / difénoconazole SYGAN / cymoxanil +folpel	GB, PZ, EN PM	19/07	KARATHANE LC / Dinocap SIRBEL / folpel+iprovalicarbe	EN PM
09/08	LEGEND / quinoxyfen SYGAN / cymoxanil +folpel	EN PM	28/07	KARATHANE LC / Dinocap SYGAN / cymoxanil +folpel	EN PM
21/08	SYGAN / cymoxanil +folpel	PM	08/08	SYGAN / cymoxanil +folpel	PM

GB : *Guignardia bidwelli* = le black rot ; PH : *Phomopsis viticola* = l'excoriose ; PM : *Plasmopara viticola* = le mildiou ; PZ : *Pseudopezicula tracheiphila* = le rougeot ; EN : *Erysiphe necator* = l'oïdium.

Annexe 2 : Fréquence d'attaques de *B. cinerea* sur baies mûres en 2004 et en 2005 dans la parcelle de Nogent l'Abbesse.

Tableau I : Fréquence de contamination des baies de vignes par *B. cinerea* suite à l'application des bactéries individuelles issues du vignoble. Les mélanges de souches ont été appliqués au sol du vignoble (NL) à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} (150 ml par plante) en 2003 et en 2004. La fréquence de contamination des baies mûres par *B. cinerea* a été déterminée le 28 octobre 2004 sur 50 grappes orientées face Est et 50 grappes orientées face Ouest du rang des vignes.

Traitements	Fréquence d'attaque (%)		
	Totale	Face Est	Face Ouest
Témoin	99	98	100
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	100	100	100
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	99	98	100
<i>B. subtilis</i> PTA-271	98	96	100
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	97	94	100
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	95	92	98
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	99	98	100
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	100	100	100

Tableau II : Fréquence de contamination des baies de vignes par *B. cinerea* suite à l'application des mélanges de bactéries issues du vignoble. Les mélanges de souches ont été appliqués au sol du vignoble (NL) à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} (150 ml par plante) en 2003 et en 2004. La fréquence de contamination des baies mûres par *B. cinerea* a été déterminée le 28 octobre 2004 sur 50 grappes orientées face Est et 50 grappes orientées face Ouest du rang des vignes.

Traitements	Fréquence d'attaque (%)		
	Totale	Face Est	Face Ouest
Témoin	99	98	100
113+152	99	98	100
AF1+AF2	97	94	100
268+CT2	100	100	100
271+AL	98	96	100
271+PA	96	94	98
271+PF	97	94	100
AL+PA	100	100	100
AL+PF	98	96	100
PA+PF	98	96	100
271+AL+PA	99	98	100
271+AL+PF	100	100	100
271+PA+PF	98	96	100
AL+PA+PF	100	100	100
271+AL+PA+PF	99	98	100

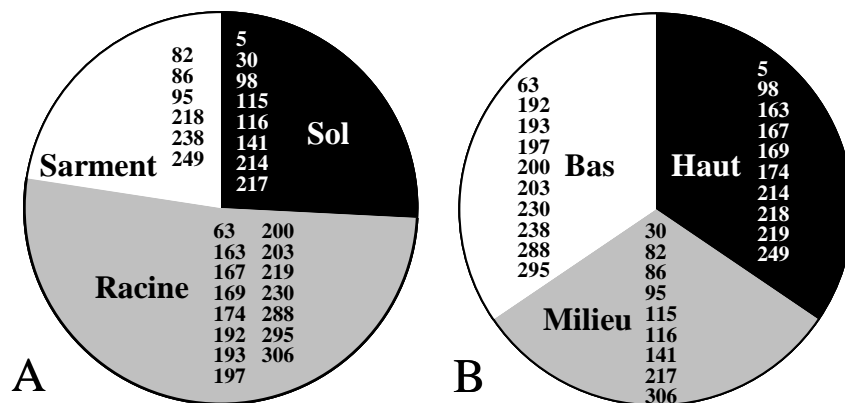
Tableau III : Fréquence de contamination des baies de vignes par *B. cinerea* suite à l'application des bactéries individuelles issues du vignoble. Les mélanges de souches ont été appliqués au sol du vignoble (NL) à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} (150 ml par plante) en 2003 et en 2004. En 2005, aucun traitement bactérien n'a été renouvelé. La fréquence de contamination des baies mûres par *B. cinerea* a été déterminée le 21 septembre 2005 sur 50 grappes orientées face Est et 50 grappes orientées face Ouest du rang des vignes.

Traitements	Fréquence d'attaque (%)		
	Totale	Face Est	Face Ouest
Témoin	78	76	80
<i>A. lwoffii</i> PTA-113	64	68	60
<i>A. lwoffii</i> PTA-152	64	60	68
<i>B. subtilis</i> PTA-271	71	68	74
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF1	68	66	70
<i>P. agglomerans</i> PTA-AF2	57	56	58
<i>P. fluorescens</i> PTA-268	83	78	88
<i>P. fluorescens</i> PTA-CT2	64	50	78

Tableau IV : Fréquence de contamination des baies de vignes par *B. cinerea* suite à l'application des mélanges de bactéries issues du vignoble. Les mélanges de souches ont été appliqués au sol du vignoble (NL) à une concentration de 1×10^8 UFC ml^{-1} (150 ml par plante) en 2003 et en 2004. En 2005, aucun traitement bactérien n'a été renouvelé. La fréquence de contamination des baies mûres par *B. cinerea* a été déterminée le 21 septembre 2005 sur 50 grappes orientées face Est et 50 grappes orientées face Ouest du rang des vignes.

Traitements	Fréquence d'attaque (%)		
	Totale	Face Est	Face Ouest
Témoin	78	76	80
113+152	64	58	70
AF1+AF2	46	48	44
268+CT2	67	66	68
271+AL	75	72	78
271+PA	61	54	68
271+PF	67	54	80
AL+PA	65	66	64
AL+PF	65	60	70
PA+PF	57	54	60
271+AL+PA	67	54	80
271+AL+PF	76	58	94
271+PA+PF	63	52	74
AL+PA+PF	55	56	64
271+AL+PA+PF	80	76	84

Annexe 3 : Origine des bactéries sélectionnées et isolées d'un vignoble de l'Aube



A Répartition des bactéries sélectionnées (protection des feuilles de vitroplants) dans les organes de la vigne et dans sa rhizosphère.

B Répartition des bactéries sélectionnées (protection des feuilles de vitroplants) en relation avec l'inclinaison de la parcelle viticole. Les isolements (à partir du sol, des sarments et des racines de la vigne) ont été réalisés suivant les techniques développées par Trotel-Aziz *et al.* (2007).

Code	Description : caractères macroscopiques	Coloration	Mc Conkey		Test	Test	Test	Mobilité
		Gram	Croiss./	Lac	Oxydase	Catalase	OF-F	
86	Crème-jaunâtres, rondes, visqueuses, rondes, léger.opaque, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	+	+	léger	-
200	Crème-laiteuses, rondes, bombées, brillantes, opaques, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	+	+	+	-
288	Crème-laiteuses, rondes, visqueuses, brillantes, léger.opaques, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	+	+	+	+
95	Jaunes, léger.opaques, contours hérissés et translucides, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	+	+	+	-
63	Jaunes, rondes, léger.opaques, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	+	+	+	+
306	Crème-jaunâtres, rondes, léger.opaques, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	+	+	+	+
5	Jaunes, arrondies, contours léger.hérissés, croissance rapide	Gram – (rose)	+	?	-	+	+	-
82	Crèmes, visqueuses, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	+	+	?	?
163	Crème-jaunâtres, arrondies, brillantes, opaques, contours nets, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	-	+
169	Jaunes, rondes, brillantes, translucides, contours nets, croissance moyenne	Gram – (rose)	+	Lac-	-	+	+	-
203	Jaune-orangées, rondes, brillantes, léger.translucides, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	+	+
214	Crème, rondes, brillantes, opaques, croissance rapide	Gram – (rose)	+	?	-	+	+	+
217	Jaune-citron, rondes, bombées, opaques, croissance rapide	Gram – (rose)	+	?	-	+	+	+
219	Crème-laiteuses, rondes, visqueuses, brillantes, contours nets, croissance lente	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	+	+
249	Jaunes-laiteuses, arrondies, brillantes	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	+	+
192	Crème-laiteuses, rondes, visqueuses, léger.translucides, contours nets, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac-	-	+	+	+
193	Beiges-laiteuses, visqueuses, translucides, croissance rapide	Gram – (rose)	+	?	-	+	+	+
238	Jaunâtres, rondes, brillantes, translucides, contours nets, croissance moyenne	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	+	+
174	Jaunes, arrondies, translucides, contours nets, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	-	+
197	Blanche-crèmes, laiteuses, arrondies, visqueuses, contours nets, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	-	+
230	Jaunes, rondes, brillantes, translucides, contours nets, croissance moyenne	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	+	+
167	Crème-jaunâtres, rondes, léger.translucides, contours nets, croissance moyenne	Gram – (rose)	+	/?	-	+	-	+
30	Beiges, rondes, brillantes, bombées, léger.translucides, contours hérissés, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	+	-
295	Jaunes, arrondies, léger.translucides, croissance rapide	Gram – (rose)	+	Lac+	-	+	léger	+
98	Blanchâtres, ronde, brillantes, léger.translucides, contours hérissés, croissance rapide	Gram + (violet)	-	/	-	+	+	-
115	Jaunes, rondes, brillantes, translucides	Gram + (violet)	-	/	-	+	-	-
116	Beiges, rondes, brillantes, croissance moyenne	Gram + (violet)	-	/	-	+	?	?
141	Jaunes, arrondies, cotonneuses, opaques, contours hérissés, croissance rapide	Gram + (violet)	-	/	-	+	?	?
218	Blanche-crèmes, arrondies, cotonneuses, opaques, croissance rapide	Gram + (violet)	-	/	-	+	+	+

Annexe 5 : Test de protection *in situ* sur feuilles et test d'antagonisme *in vitro* sur milieu PDA vis-à-vis de *B. cinerea* en réponse aux bactéries sélectionnées

Code	Identification ^a	Protection contre <i>B. cinerea</i> (%)			Inhibition <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> (%) ^e
		Test CH1 ^b	Test CH2 ^c	Test M ^d	
86	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	33	34	37	-
200		27	64*	79*	-
288		20	71*	91*	-
95	<i>Pseudomonas spp.</i>	56*	39	32	-
63	<i>Burkholderia cepacia</i>	58*	54*	40	-
306		38	86*	80*	-
5	<i>Pantoea spp.3</i>	38*	66*	10	-
82	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	46	92*	11	+
163	<i>Enterobacter cloacae</i>	38	78*	ND	-
169		29	92*	6	-
203	<i>Enterobacter aerogenes</i>	16	90*	12.5	-
214		35	15	57*	-
217		28	89*	ND	-
219		33	88*	60*	-
249		29	67*	95*	-
192	<i>Serratia fronticola</i>	19	47*	11	-
193		52	0	82*	-
238		27	43*	31	-
174	<i>Rahnella aquatilis</i>	63*	85*	35	-
197		52	91*	65*	-
230		56*	100*	85*	-
167	<i>Citrobacter freundii</i>	12	90*	ND	-
30	<i>Chryseomonas luteola</i>	35*	60*	2	-
295	<i>Chryseabacterium</i>	18	77*	28	-
98	<i>Bacillus cereus</i>	64*	2	ND	-
115		23	90*	13	-
116		42	80*	13	-
141		75*	14	30	-
218		29	76*	20	-

Identification :

a Les galeries API (Analytical Profil Index) sont utilisées pour identifier les bactéries sélectionnées : API20E, pour identifier les *Enterobacteriaceae*, API20NE pour les bactéries Gram-négative non-entériques et API50CH pour les bactéries Gram-positive et *Enterobacteriaceae* positive.

Protection :

Les souches ont été incubées en présence des feuilles de vitroplants de vigne pendant 16 heures. Puis les feuilles, délicatement essuyées, sont artificiellement inoculées par une suspension conidienne de *B. cinerea* (10^5 spores ml⁻¹). 7 jours après l'inoculation des feuilles, les nécroses sont mesurées et le pourcentage de protection est évalué.

b : température moyenne de 30°C le jour et de 28°C la nuit, cépage Chardonnay

c : température moyenne de 24°C le jour et de 20 °C la nuit, cépage Chardonnay

d : température moyenne de 24°C le jour et de 20 °C la nuit, cépage Merlot

L'astérisque indique que les valeurs sont significativement différentes par rapport au témoin d'après le test de Duncan ($p < 0,05$).

Antagonisme :

e Test d'antagonisme : incubation d'une souche bactérienne pendant 24 heures au centre d'une boîte de Pétri contenant du PDA (Potatoes Dextrose Agar), puis est inoculée par une suspension de *B. cinerea* (1×10^5 spores ml⁻¹).

Annexe 6 : Curriculum vitae – Maryline MAGNIN-ROBERT

1. Publications scientifiques

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S. & Aziz, A. (2007) Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. European Journal of Plant Pathology 118 : 43-57.

Magnin-Robert, M., Aziz; A., Biagianti, S. & Trotel-Aziz, P. : Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S. & Aziz, A. (2007) Biological control of *Botrytis cinerea* by mixtures of bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. (soumise)

Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz; A., Biagianti, S. & Aziz, A. Non-pathogenic bacteria induced lipoxygenase activity, change of fatty acid content and resistance of grapevine (*Vitis vinifera* L.) to *Botrytis cinerea*. (soumise)

Publications dans des revues internationales sans comité de lecture

Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Biagianti, S. & Aziz, A. (2007) Protection of grapevine against gray mold disease and activation of chitinase and β -1,3-glucanase by native rhizobacteria under field conditions. In "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, fundamental and practical approaches to increase biocontrol efficacy" Ed. Y. Elad, Y., Ongena, M., Höfte, M. & Jijakli, H. IOBC/wprs Bulletin 30 : 209-213.

2. Brevet

Trotel-Aziz, P., Aziz, A., **Magnin-Robert, M.**, Aït Barka, E. & Gognies, S. (2007) Bactéries présentant une activité protectrice de la vigne contre *Botrytis cinerea*. French patent 06.06.513.

3. Communications à des congrès internationaux

Magnin-Robert M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S. & Aziz, A. (2006) Induction of resistance to *Botrytis cinerea* in field grown *Vitis vinifera* by selected native rhizobacteria and pathogenesis-related proteins activity. First international symposium on macromolecules and secondary metabolites of grapevine and wines- MACROWINE, Reims, France 118-20 May 2004. (Résumé)

Magnin-Robert M., Trotel-Aziz, P., Biagianti, S. & Aziz, A. (2004) Induction of defense-related responses of grapevine by selected biocontrol rhizobacteria of *Botrytis cinerea*. Control of grapevine diseases, Epernay, France 19-20 November 2004. (Présentation orale)

Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S. & Aziz, A. (2006) Induction of resistance to *Botrytis cinerea* in field-grown grapevine by selected native rhizobactérie. Working group " Biological control of fungal and bacterial plant pathogens". "Fundamental and practical approaches to increase biocontrol efficacy". Spa, Belgique 6-10 Septembre 2006. (Poster)

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Reuveni, M., Zhu, J.K., Niu, X., Singh, N.K., Hasegawa, P.M. et Bressan, R.A. (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science* **118** : 11-23.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A. et Bessis, R. (1997) Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology*. **23** : 1689-1702.
- Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Tesson, L. et Bessis, R. (2000) Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **48** : 6103-6105.
- Ait Barka, E., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.-C. et Belarbi, A. (2002) Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological control* **24** : 135-142.
- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C. et Vernet, G. (2004) Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports* **22** : 608-614.
- Alexander, D., Goodman, R., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. et Ryals, J. (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **90** : 7327-7331.
- Altindag, M., Sahin, M., Esitken, A., Ercisli, S., Guleryuz, M., Donmez, M.F. et Sahin, F. (2006) Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. *Biological Control* **38** : 369-372.
- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F. et Heulin, T. (1998) Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* **64** : 3740-3747.
- Anderson, L.M., Stockwell, V.O. et Loper, J.E. (2004) An extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* inactivates antibiotics of *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology* **94** : 1228-1234.
- Ano, A., Takayanagi, T., Uchibori, T., Okuda, T. et Yokotsuka, K. (2003) Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95** : 645-647.
- Archbold, D.D., Hamilton-Kemp, T.R., Barth, M.M. et Langlois, B.E. (1997) Identifying natural volatile compounds that control gray mold (*Botrytis cinerea*) during postharvest storage of strawberry, blackberry, and grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** : 4032-4037.
- Asaka, O. et Shoda, M. (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied Environmental and Microbiology* **62** : 4081-4085.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P. et Höfte, M. (2002) Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 : role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15** : 1147-1156.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M. et Laakso, S. (1981) Lipoxygenase from soybeans EC 1.13.11.12 Linoleate : oxygen oxidoreductase. *Methods in Enzymology* **71** : 441-451

- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M. et Pugin, A.** (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** : 1118-1128.
- Aziz, A., Heyraud, A. et Lambert, B.** (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* **218** : 767-774.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. et Vernet, G.** (2006) Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* **96** : 1188-1194.
- Aziz, A., Gauthier, A., Bézier, A., Poinssot, B., Joubert, J., Pugin, A., Heyraud A. et Baillieul, F.** (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of β -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with β -1,3 glucans and α -1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany* **58** : 1463-1472.
- Bacon, C.W., Hinton, D.M. et Hinton, A.** (2006). Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* **100** : 185-194.
- Bai, Y., Pan, B., Charles, T.C. et Smith, D.L.** (2002) Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean (*Glycine max* (L.) Merr) grown in soil-less media. *Soil Biology and Biochemistry* **34** : 1953-1957.
- Bais, A.J., Murphy, P.J. et Dry, I.B.** (2000) The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Australian Journal of Plant Physiology* **27** : 425-433.
- Bakker, P.A.H.M., Ran, L.X., Pieterse, C.M.J. et Van Loon, L.C.** (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25** : 5-9.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwood, J.E. et Jacobsen, B.J.** (2002) Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Pathology* **61** : 289-298.
- Bavaresco, L., Petegolli, D., Cantù, E., Fregoni, M., Chiusa, G. et Trevisan, M.** (1997) Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis* **36** : 77-83.
- Beffa, R., Szell, M., Meuwly, P., Pay, A., Vögeli-Lange, R., Métraux, J.P., Neuhaus, G., Meins Jr., F. et Nagy, F.** (1995) Cholera toxins elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *The EMBO Journal* **14** : 5753-5761.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M. F. and Merillon, J. M.** (2006) Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** : 9119-9125.
- Ben-Arie, R., Sarig, P., Shacham, Z.K. et Lisker, N.** (1999) Natural and induced resistance of table grapes to postharvest decay. In Gerasopoulos D. (ed.). *Post-harvest losses of perishable horticultural products in the Mediterranean region*. Chania : CIHEAM-IAMC, 1999. p. 85-89.
- Benhamou, N., Bélanger, R.R. et Paulitz, T.C.** (1996a) Pre-inoculation of Ri-T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum*. Trow : an ultrastructural and cytochemical study. *Planta* **199** : 105-117.
- Benhamou, N., Kloepper, J.W., Quadt-Hallman, A. et Tuzun, S.** (1996b) Induction of defense-related ultrastructural modifications on pea root, tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiology* **112** : 919-929.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. et Hallmann, J.** (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology* **51** : 215-229.

- Berto, P., Jijakli, M.H. et Lepoivre, P.** (2001) Possible role of colonization and cell wall-degrading enzymes in the differential ability on three *Ulocladium atrum* strains to control *Botrytis cinerea* on necrotic strawberry leaves. *Biological control* **91** : 1030-1036.
- Bézier, A., Lambert, B. et Baillieul, F.** (2002) Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **108** : 111-120.
- Bézier, A.** (2003) Caractérisation de gènes de défense exprimés par la vigne en réponse à l'infection par *Botrytis cinerea* par la technique de differential display RT-PCR. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims (France) pp. 337.
- Bishop, J.G., Dean, A.M. et Mitchell-Olds, T.** (2000) Rapid evolution in plant chitinases : molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **97** : 5322-5327.
- Blée, E.** (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* **37** : 33-72.
- Blée, E.** (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7** : 315-321.
- Bligh, E.G. et Dyer, W.J.** (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37** : 911-917.
- Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N. et Scheel, D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant Cell* **12** : 1425-1440.
- Bohland, C., Balkenhohl, T., Loers, G., Feussner, I. et Grambow, H.J.** (1997) Differential induction of lipoxygenase isoforms in wheat upon treatment with rust fungus elicitor, chitin oligosaccharides, chitosan, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **114** : 679-685.
- Boland, G.J.** (1997) Stability analysis for evaluating the influence of environment on chemical and biological control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of bean. *Biological Control* **9** : 7-14.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijfjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J. et Bloemberg, G.V.** (2003) Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** : 983-993.
- Bonomelli, A.** (2003) Amélioration de la tolérance de la vigne aux agents pathogènes. Etude de deux approches : transgénèse et stimulation des défenses naturelles. Thèse de l'INPL, Nancy (France) pp. 200.
- Bonomelli, A., Mercier, L., Franchel, J., Baillieul, F., Benizri, E. et Mauro, M.-C.** (2004) Response of grapevine defenses to UV-C exposure. *American Journal of Enology and Viticulture* **55** : 51-59.
- Borie, B., Jeandet, P., Parize, A., Bessis, R. et Adrian, M.** (2004) Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American Journal of Enology and viticulture* **55** : 60-64.
- Bornhoff, B.-A., Harst, M., Zyprian, E. et Töpfer, R.** (2005) Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv. Seyval blanc. *Plant Cell Reports* **24** : 433-438.
- Bortolotti, C., Murillo, I., Fontanet, P., Coca, M. et San Segundo, B.** (2005) Long-distance transport of the maize pathogenesis-related PRms protein through the phloem in transgenic tobacco plants. *Plant Science* **168** : 813-821.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. et Lamb, C.J.** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a plant cell wall proline-rich protein : a novel, rapid defense response. *Cell* **70** : 21-30.

- Braun, S.G., Meyer, A., Holst, O., Pühler, A. et Niehaus, K.** (2005) Characterization of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* lipopolysaccharide subcultures essential for elicitation of an oxidative burst in tobacco cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18** : 674-681.
- Breuil, A.-C., Adrian, M., Pirio, N., Meunier, P., Bessis, R. et Jeandet, P.** (1998) Metabolism of stilben phytoalexin by *Botrytis cinerea*: 1. Characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Letters* **39** : 537-540.
- Brimecombe, M.J., Leij, F.A.A.M.D. et Lynch, J.M.** (1999) Effect of introduced *Pseudomonas fluorescens* strains on soil nematode and protozoan populations in the rhizosphere of wheat and pea. *Microbial Ecology* **38** : 387-397.
- Brogliè, K.E., Biddle, P., Cressman, R. et Brogliè, R.** (1989) Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco. *The Plant Cell* **1** : 599-607
- Brooks, D.S., Gonzalez, C.F., Appel, D.N. et Filer, T.H.** (1994) Evaluation of endophytic bacteria as potential biological-control agents for oak wilt. *Biological Control* **4** : 373-381.
- Bru, R., Selles, S., Casado-Vela, J., Belchi-Navarro, S. et Pedreno, M.A.** (2006) Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** : 65-71.
- Bryk, H., Sobiczewski, P. et Dyki, B.** (1998) Antagonistic effect of *Erwinia herbicola* on *in vitro* spore germination and germ tube elongation of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Biocontrol* **43** : 97-106.
- Bulit, J. et Lafon, R.** (1977) Observations sur la contamination des raisins par le *Botrytis cinerea* pers., 61-69. Travaux dédiés à Georges Viennot-Bourgin. Société Française de Phytopathologie, 61-69.
- Bull, C.T., Weller, D.M. et Thomashow, L.S.** (1991) Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology* **81** : 954-959.
- Busam, G., Kassemeyer, H.-H. et Matern, U.** (1997) Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology* **115** : 1029-1038.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J. et Höfte, M.** (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and Environmental Microbiology* **62** : 865-871.
- Campbell, P.A. et Latorre, B.A.** (2004) Suppression of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) by acidenzolar-S-methyl. *Vitis* **4** : 209-210.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I. et Herrera-Estrella, A.** (1999) Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Applied Environmental Microbiology* **65** : 929-935.
- Cartieaux, F., Thibaud, M.-C., Zimmerli, L., Lessard, P., Sarrobert, C., David, P., Gerbaud, A., Robaglia, C., Somerville, S. et Nussaume, L.** (2003) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal* **36** : 177-188.
- Castoria, R., Fanelli, C., Zoina, A. et Scala, F.** (1995) Analysis of fatty acids in lipids of *Verticillium dahliae* and induction of lubimin accumulation in eggplant. *Plant Pathology* **44** : 791-795.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S. et De Cicco, V.** (2001) *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits : study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology* **22** : 1-7.
- Chandra, S., et Low, P.S.** (1995) Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92** : 4120-4123.

- Chandra, S., Heinstein, P.F. et Low, P.S.** (1996) Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiology* **110** : 979-986.
- Chardonnet, C., Gomez, H. et Donèche, B.** (1994). Evolution des polyosides des parois cellulaires au cours du développement du raisin. *Vitis* **33** : 69-74.
- Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguezkabana, R. et Kloepper, J.W.** (1995) Biological control of fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control* **5** : 83-91.
- Chen, Z.-Y., Brown, R.L., Lax, A.R., Cleveland, T.E. et Russin, J.S.** (1999) Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **65** : 1320-1324.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. et Paulitz, T.C.** (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56** : 13-23.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. et Chet, I.** (1995) Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **61** : 1720-1726.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H.M., Dekkers, L.C. et Lugtenberg, B.** (2000) Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13** : 1340-1345.
- Cohen, Y., Reuveni, M. et Baider, A.** (1999) Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. *European Journal of Plant Pathology* **105** : 351-361.
- Comménil, P.** (1995) Lipase, enzyme de pathogénéicité ? Approche enzymatique de la pénétration cuticulaire de la baie de raisin (*Vitis vinifera* L., cépage champenois de pinot noir) par l'agent de la pourriture grise *Botrytis cinerea* (téléomorphe *Botryotinia fuckeliana* De Bary). Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims (France) pp. 187.
- Comménil, P., Belingheri, L., Audran, J.C., Collas, A. et Dehorter, B.** (1996) 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* **30** : 7-13.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C. et Barka, E.A.** (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* **71** : 1685-1693.
- Conconi, A., Miquel, M., Browse, J.A. et Ryan, C.A.** (1996) Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiology* **111** : 797-803.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Augustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendeheime, D., Zimmerli, L. et Mauch-mani, B.** (2006) Priming : Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19** : 1062-1071.
- Cook, R.J.** (1993) Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **31** : 53-80.
- Cordero, M.J., Raventos, D. et San Segundo, B.** (1994) Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection : systemic wound-response of a monocot gene. *The Plant Journal* **6** : 141-150.
- Cornelis, P. et Matthijs, S.** (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads : not only pyoverdines. *Environmental Microbiology* **4** : 787-798.
- Côté, F. et Hahn, M.G.** (1994) Oligosaccharins : structure and signal transduction. *Plant Molecular Biology* **26** : 1379-1411.

- Coubart, C. et Reulet, P.** (2000) Les résidus de produits phytosanitaires dans les raisins et les vins. Le point sur les deux dernières années d'enquêtes résidus de la SDQPV. *Phytoma la défense des végétaux* **532** : 30-39.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R., et Boulay, M.** (2001) *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* **52** : 901-910.
- Coventry, H.S. et Dubery, I.A.** (2001) Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **58** : 149-158.
- Croft, K.P.C., Jüttner, F. et Slusarenko, A.J.** (1993) Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology* **101** : 13-24.
- Curtin, C., Zhang, W. et Franco, C.** (2003) Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. *Biotechnology Letters* **25** : 1131-1135.
- Dai, G.H., Andary, G., Mondolot-Cosson, L. et Boubals, D.** (1995a) Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46** : 177-188.
- Dai, G.H., Andary, G., Mondolot-Cosson, L. et Boubals, D.** (1995b) Histochemical responses leaves of in vitro plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* **85** : 149-154.
- Datta, K., Tu, J., Oliva, N., Ona, I., Velazhahan, R., Mew, T.W., Muthukrishnan, S. et Datta, S.K.** (2001) Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science* **160** : 405-414.
- Davet, P.** (1996) Vie microbienne du sol et production végétale. Editions INRA, Paris (France)
- Davies, K.G. et Whitbread, R.** (1989) Factors affecting the colonisation of a root system by fluorescent pseudomonads: the effects of water, temperature and soil microflora. *Plant and Soil* **116** : 247-256.
- De Boer, M., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C. et Bakker, P.A.H.M.** (1999) Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strain to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology* **105** : 201-210.
- De Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J.J.B., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M.** (2003) Control of fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* **93** : 626-632.
- De Boer, W., Wagenaar, A.-M., Klein Gunnewiek, P.J.A. et Van Veen, J.A.** (2007) *In vitro* suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **59** : 177-185.
- Deikman, J.** (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum* **100** : 561-566
- de la Cruz, A.R., Poplawsky, A.R. et Wiese, M.V.** (1992) Biological suppression of potato ring rot by fluorescent pseudomonads. *Applied Environmental Microbiology* **58** : 1986-1991.
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J.-F., Gaymard, F. et Expert, D.** (2005) Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant Journal* **43** : 262-272.
- De Lorenzo, G. et Ferrari, S.** (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **5** : 295-299.

- Del Rio J.A., Gonzales A., Fuster M.D., Botia J.M., Gomez P., Frias V. et Ortuno A.** (2001) Tyloses formation and changes in phenolics compounds in grape roots affected with *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeocremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea* **40** : 394-399.
- De Matos Nogueira, E., Vinagre, F., Masuda, H.P., Vargas, C., Muniz de Padua, V.L., Da Silva, F.R., Dos Santos, R.V., Baldani, J.I., Cavalcanti, P., Ferreira, G. et Hemerly, A.S.** (2001) Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genetics and Molecular Biology* **24** : 199-206.
- De Meyer, G. et Höfte, M.** (1997) Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* **87** : 588-593.
- De Meyer, G., Capieau, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J.P. et Höfte, M.** (1999) Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12** : 450-458.
- Derckel, J.-P., Legendre, L., Audran, J.-C., Haye, B. et Lambert, B.** (1996) Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera*) : five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Science* **119** : 31-37.
- Derckel, J.-P., Legendre, L., Audran, J.-C., Haye, B. et Lambert, B.** (1998a) Chitinases et β -1,3-glucanases : des protéines de défense de la vigne contre la pourriture grise. *Le vigneron Champenois* **7** : 45-53.
- Derckel, J.-P., Audran, J.-C., Haye, B., Lambert, B. et Legendre, L.** (1998b) Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum* **104** : 56-64.
- Derckel, J.-P., Baillieul, F., Manteau, S., Audran, J.-C., Haye, B., Lambert, B. et Legendre, L.** (1999) Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **89** : 197-203.
- Dercks, W. et Creasy, L.L.** (1989) The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **34** : 189-202.
- De Souza, J.T., De Boer, M., De Waard, P., Van Beek, T.A. et Raaijmakers, J.M.** (2003) Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Environmental Microbiology* **69** : 7161-7172.
- Dik, A.J., Koning, G. et Köhl, J.** (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology* **105** : 115-122.
- Dodd, S.L. et Stewart, A.** (2003) RAPD-PCR and UP-PCR techniques distinguish a *Pithomyces chartarum* isolate with biocontrol capabilities against *Botrytis cinerea* on grape (*Vitis vinifera*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **31** : 55-64.
- Domenech, J., Ramos, S., Probanza, A., Lucas, G. and Gutierrez, M.** (2007) Elicitation of systemic resistance and growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by PGPRs from *Nicotiana glauca* : a study of the putative induction pathway. *Plant and Soil* **290** : 43-50.
- Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-Z. et Zhang, L.-H.** (2000) AIA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **97** : 3526-3531.
- Doumbou, C.L., Akimov, V. et Beaulieu, C.** (1998) Selection and characterization of microorganisms utilizing thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Applied Environmental Microbiology* **64** : 4313-4316.
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. et Bellincampi, D.** (2004) Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1696** : 237-244.

- Dow, M., Newman, M.-A. et Von Roepenack, E.** (2000) The induction and modulation of plant defense response by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology* **38** : 241-261.
- Dowling, D.N. et O’Gara, F.** (1994) Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology* **12** : 133-141.
- Duffy, B.K. et Défago, G.** (1997) Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* **87** : 1250-1257.
- Duffy, B.K. et Défago, G.** (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* **65** : 2429-2438.
- Duffy, B., Keel, C. et Defago, G.** (2004) Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. *Applied Environmental Microbiology* **70** : 1836-1842.
- Duijff, B.J., Meijer, J.W., Bakker, P.A.H.M. et Schippers, B.** (1993) Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Netherland Journal of Plant Pathology* **99** : 277-289.
- Duijff, B.J., Gianinazzi-Pearson, V. et Lemanceau, P.** (1997) Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist* **135** : 325-334.
- Dunne, C., Moenne-Loccoz, Y., McCarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D.N. et O’Gara, F.** (1998) Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathology* **47** : 299-307.
- Durner, J. et Klessig, D.F.** (1995) Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichlororisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92** :11312-11316.
- Dwivedi, D. et Johri, B.N.** (2003) Antifungals from fluorescent pseudomonads : biosynthesis and regulation. *Current Science* **85** : 1693-1703.
- Eckey-Kaltenbach, H., Kiefer, E., Grosskopf, E., Ernst, D. et Sandermann Jr, H.** (1997) Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock. *Plant Molecular Biology* **33** : 343-350.
- Elad, Y., Yunis, H. et Katan, T.** (1992) Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. *Plant Pathology* **41** : 41-46.
- Elad, Y., Köhl, J. et Fokkema, N.J.** (1994a) Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology* **84** : 1193-1200.
- Elad, Y., Köhl, J. et Fokkema, N.J.** (1994b) Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* **100** : 315-336.
- Elad, Y.** (2000) *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases - control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology* **10** : 499-507.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C.L. et Wisniewski, M.** (1998) Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology* **88** : 282-291.
- Ellard-Ivey, M. et Douglas, C.J.** (1996) Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiology* **112** : 183-192.
- Elmer, P.A.G. et Reglinski, T.** (2006) Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **5** : 155-177.

- Epple, P., Apel, K. et Bohlmann, H.** (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* **9** : 509-520.
- Eyal, Y., Meller, Y., Lev-Yadun, S. et Fluhr, R.** (1993) A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *The Plant Journal* **4** : 225-234.
- Fallik, E, Archbold, D.D., Hamilton-Kemp, T.R., Clements, A.M., Collins, R.W. et Barth, M.M.** (1998) (E)-2-hexenal can stimulate *B. cinerea* growth *in vitro* and on strawberries *in vivo* during storage. *Journal American of Society Horticultural Science* **123** : 875-881.
- Farmer, E.E. et Ryan, C. A.** (1992) Octadecanoid-derived signals in plants. *Trends in Cell Biology* **2** : 236-241.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. et Boller, T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* **18** : 265-276.
- Fenton, A.M., Stephens, P.M., Crowley, J., O'Callaghan, M. et O'Gara, F.** (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58** : 3873-3878.
- Ferreira, J.H.S.** (1990) In-vitro evaluation of epiphytic bacteria from table grapes for the suppression of *Botrytis cinerea*. *South Africa Journal of Enology and Viticulture* **11** : 38-41.
- Fidantsef, A.L., Stout, M.J., Thaler, J.S., Duffey, S.S. et Bostock, R.M.** (1999) Signal interactions in pathogen and insect attack : expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **54** : 97-114.
- Fofana, B., McNally, D.J., Labbé, C., Boulanger, R., Benhamou, N., Séguin, A. et Bélanger, R.R.** (2002) Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **61** : 121-132.
- Francès, J., Bonaterra, A., Moreno, M.C., Cabrefiga, J., Badosa, E. et Montesinos, E.** (2006) Pathogen aggressiveness and postharvest biocontrol efficiency in *Pantoea agglomerans*. *Postharvest Biology and Technology* **39** : 299-307.
- Fritig, B., Heitz, T. et Legrand, M.** (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* **10** : 16-22.
- Fukui, R., Fukui, H. et Alvarez, A.M.** (1999) Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of *Anthurium* blight. *Phytopathology* **89** : 367-373.
- Galet, P.** (1977) Les maladies et les parasites de la vigne. (Montpellier: Paysan de midi).
- Gao, A.-G., Hakimi, S.M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, B.M., Stark, D.M., Shah, D.M., Liang, J. et Rommens, C.M.T.** (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* **18** : 1307-1310.
- Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K. et De Ley, L.** (1989) Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39** : 337-345
- Georgakopoulos, D.G., Fiddaman, P., Leifert, C. et Malathrakis, N.E.** (2002) Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *Journal of Applied Microbiology* **92** : 1078-1086.
- Gerber, I.B., Zeidler, D., Durner, J. et Dubery, I.A.** (2004a) Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta* **218** : 647-657.

- Gerber, I.B. et Dubery, I.A.** (2004b) Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry* **65** : 2957-2966.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Renato de Freitas, J. et Seib, A.M.** (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* **26** : 43-50.
- Giannakis, C., Bucheli, C.S., Skene, K.G.M., Robinson, S.P. et Steele Scott, N.** (1998) Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves : a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4** : 14-22.
- Giddens, S.R., Houlston, G.J. et Mahanty, H.K.** (2003) The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) Eh1087 and *Erwinia amylovora* in planta. *Environmental Microbiology* **5** : 1016-1021.
- Giraud, T., Lewis, C., Fortini, D., Leroux, P. et Brygoo, Y.** (1998) Plusieurs espèces cachées sous le nom de *Botrytis cinerea* - Etude de population de *Botrytis cinerea* sur vignes champenoises. *Phytoma la défense des végétaux* **504** : 56-60
- Gindro, K., Pezet, R. et Viret, O.** (2003) Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry* **41** : 846-853.
- Glazebrook, J.** (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabopsis*- 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* **4** : 301-308.
- Glick, B.R.** (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41** : 109-117.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R. et Pont, V.** (1999) Resistance factors to grey mould in grape berries : identification of some phenolics inhibitors on *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52** : 759-167.
- Gomès, E., Sagot, E., Gaillard, C., Laquitaine, L., Poinssot, B., Sanejouand, Y.-H., Delrot, S. et Coutos-Thévenot, P.** (2003) Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** : 456-464.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. et Boller, T.** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18** : 277-284.
- Görlach, J., Raesecke, H.-R., Rentsch, D., Regenast, M., Roy, P., Zala, M., Keel, C., Boller, T., Amrhein, N. et Schmid, J.** (1995) Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92** : 3166-3170.
- Graham, T.L., Sequeira, L. et Huang, T.-S.R.** (1977). Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* **34** : 424-432.
- Graham, L.S. et Sticklen, M.B.** (1994). Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany* **72** : 1057-1083.
- Grechkin, A.** (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research* **37** : 317-352.
- Green, R. et Fluhr, R.** (1995) UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *The Plant Cell* **7** : 203-212.
- Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D. et Dinooor, A.** (2002a) Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guilliermondii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology* **12** : 705-714.

- Guetsky, R., Elad, Y., Shtienberg, D. et Dinooor, A.** (2002b) Improved biocontrol of *Botrytis cinerea* on detached strawberry leaves by adding nutritional supplements to a mixture of *Pichia guillemontii* and *Bacillus mycooides*. *Biocontrol Science and Technology* **12** : 625-630.
- Guillen, P., Guis, M., Martinez-Reina, G., Colrat, S., Dalmayrac, S., Deswarte, C., Bouzayen, M., Roustan, J.-P., Fallot, J., Pech, J.-C. et Latche, A.** (1998) A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Vigna radiata* confers resistance to the grapevine fungal toxin eutypine. *The Plant Journal* **16** : 335-343.
- Gutierrez-Campos, R., Torres-Acosta, J.A., Saucedo-Arias, L.J. et Gomez-Lim, M.A.** (1999) The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyvirus in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology* **17** : 1223-1226.
- Haas, D. et Keel, C.** (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **41** : 117-153.
- Haas, D. et Defago, G.** (2005) Biological control of soil-born pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* **3** : 307-319.
- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H. et Stenzel, K.** (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361** : 153-156.
- Hamdan, H., Weller, D. M. and Thomashow, L.S.** (1991) Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied Environmental Microbiology* **57** : 3270-3277.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.-M. et Mauch-Mani, B.** (2005a) β -aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18** : 819-829.
- Hamiduzzaman, M.M.** (2005b) β -aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew (*Plasmopara viticola*). Thèse de l'Université de Neuchâtel, Neuchâtel (Suisse) pp.163.
- Hammerschmidt, R.** (1999) Phytoalexins : what have we learned after 60 years. *Annual Review of Phytopathology* **37** : 285-306.
- Hammerschmidt, R., Métraux, J.P. et Van Loon, L.C.** (2001) Inducing resistance : a summary of papers presented at the First International Symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology* **107** : 1-6.
- Hammond-Kosack, K.E. et Jones, J.D.G.** (1996) Resistance gene-dependant plant defense responses. *The Plant Cell* **8** : 1773-1791.
- Han, S.H., Anderson, A.J., Yang, K.Y., Cho, B.H., Kim, K.Y., Lee, M.C., Kim, Y.H. et Kim, Y.C.** (2006) Multiple determinants influence root colonization and induction of induced systemic resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Molecular Plant Pathology* **7** : 463-472.
- Handelsman, J. et Stabb, E.V.** (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* **8** : 1855-1869.
- Hannusch, D.J. et Boland, G.J.** (1996) Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mold of bean. *European Journal of Plant Pathology* **102** : 133-142.
- Hashidoko, Y., Nakayama, T., Homma, Y. et Tahara, S.** (1999) Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. *Tetrahedron Letters* **40** : 2957-2960.
- Heil, M.** (2002) Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **5** : 345-350.
- Heintz, C. et Blauch, R.** (1990) Ultrastructural and histochemical studies on interactions between *Vitis vinifera* L. and *Uncinula necator* (Schw.) Burr. *New Phytologist* **115** : 107-117.

- Heitz, T., Bergey, D.R. et Ryan, C.A.** (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **114** : 1085-1093.
- Hervas, A., Landa, B.B. et Jimenez-Diaz, M.** (1997) Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from *Fusarium* wilt by seed treatment with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology* **103** : 631-642
- Hill, G., Stellwaag-Kittler, F., Huth, G. et Schlösser, E.** (1981) Resistance of grapes in different developmental stages to *Botrytis cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift* **102** : 328-338.
- Hoffland, E., Pieterse, C.M.J., Bik, L. et Van Pelt, J.A.** (1995). Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **46** : 309-320.
- Hoffman, T., Schmidt, J.S., Zheng, X. et Bent, A.F.** (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiology* **119** : 935-950.
- Holtorf, S., Ludwig-Müller, J., Apel, K. et Bohlmann, H.** (1998) High-level expression of a viscotoxin in *Arabidopsis thaliana* gives enhanced resistance against *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Molecular Biology* **36** : 673-680.
- Holz, G., Gütschow, M. et Coertze, S.** (2003) Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Disease* **87** : 351-358.
- Hoos, G et Blaich, R.** (1990) Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelium growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Journal of Phytopathology* **129** : 102-110.
- Horwath, W.R., Elliott, L.F. et Lynch, J.M.** (1998) Influence of soil quality on the function of inhibitory rhizobacteria. *Letters in Applied Microbiology* **26** : 87-92.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J. et Ryan, C.A.** (1996) An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *The Plant Cell* **8** : 2067-2077.
- Hu, X., Bidney, D.L., Yalpani, N., Duvick, J.P., Crasta, O., Folkerts, O. et Lu, G.** (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* **133** : 170-181.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. et Métraux, J.P.** (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** : 851-858.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M. et Faoro, F.** (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** : 4406-4413.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. et Scheel, D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **94** : 4800-4805.
- Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J. et Maas, C.** (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal* **8** : 97-109.
- Jackson, P.A.P., Galinha, C.I.R., Pereira, C.S., Fortunato, A., Soares, N.C., Amâncio, S.B.Q. et Ricardo, C.P.P.** (2001) Rapid deposition of extensin during elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase. *Plant Physiology* **127** : 1065-1076.
- Jacobs, A.K., Dry, I.B. et Robinson, S.P.** (1999) Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology* **48** : 325-336.

- Janisiewicz, W. et Bors, B.** (1995) Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Applied Environmental Microbiology* **61** : 3261-3267.
- Janisiewicz, W.J.** (1996) Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology* **86** : 473-479.
- Jeandet, P., Sbaghi, M. et Bessis, R.** (1992) The production of resveratrol, 3,5,4'-trihydroxystilbene, by grapevine in vitro cultures, and its application to screening for grey mould resistance. *Journal of Wine Research* **3** : 47-57.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M. and Meunier, P.** (1995) Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology* **143** : 135-139.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. et Adrian, M.** (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** : 2731-2741.
- Jetiyanon, K., Klopper, J.W.** (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control* **24** : 285-291.
- Ji, P., Campbell, H.L., Klopper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V. et Wilson, M.** (2006) Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control* **36** : 358-367.
- Jijakli, H. et Lepoivre, P.** (1998) Characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology* **88** : 335-343.
- Johnson, R., Narvaez, J., An, G. et Ryan, C.** (1989) Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants : effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **86** : 9871-9875.
- Joubert, D.A., Slaughter, A.R., Kemp, G., Becker, J.V.W., Krooshof, G.H., Bergmann, C., Benen, J., Pretorius, I.S. et Vivier, M.A.** (2006) The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Research* **15** : 687-702.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I. et Chernin, L.** (2003) Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil biology and Biochemistry* **35** : 323-331.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N. et Lugtenberg, B.** (2006) Organic acids, sugars, L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19** : 250-256.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. et Shimamoto, K.** (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **96** : 10922-10926.
- Kazmar, E.R., Goodman, R.M., Grau, C.R., Johnson, D.W., Nordheim, E.V., Undersander, D.J. et Handelsman, J.** (2000) Regression analyses for evaluating the influence of *Bacillus cereus* on alfalfa yield under variable disease intensity. *Phytopathology* **90** : 657-665.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. et Défago, G.** (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 - importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5** : 4-13.
- Keller, M., Rogiers, S.Y. et Schultz, H.R.** (2003) Nitrogen and ultraviolet radiation modify grapevines susceptibility to powdery mildew. *Vitis* **42** : 87-94.

- Kessel, G.J.T., De Haas, B.H., Van der werf, W. et Köhl, J.** (2002) Competitive substrate colonisation by *Botrytis cinerea* and *Ulocladium atrum* in relation biological control of *B. cinerea* in cyclamen. *Mycological Research* **106** : 716-728.
- Kilic-Ekici, O. et Yuen, G.Y.** (2004) Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. *Biological Control* **30** : 446-455.
- Kim, D.-S., Weller, D.M. et Cook, R.J.** (1997) Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* **87** : 559-564.
- Kim, B.S., Moon, S.S. et Hwang, B.K.** (1999) Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. *Canadian Journal of Botany* **77** : 850-858.
- Kim, J.-A., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Han, K.-S., Kim, K.-N., Yun, C.-H., Heu, S., Park, S.-Y., Lee, Y.-H. et Jwa, N.-S.** (2003) Molecular cloning and mRNA analysis of a novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, OsEDR1, an ortholog of *Arabidopsis* AtEDR1, reveal its role in defense/stress signalling pathways and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300** : 868-876.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.-M., Yvin, J.-C., Kopp, M., Kloareg, B. et Fritig, B.** (2000) Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* **124** : 1027-1037.
- Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.-C., Kloareg, B. et Fritig, B.** (2003) Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe interactions* **2003** : 115-122.
- Kleeberger, A., Castorph, H. et Klingmüller, W.** (1983) The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. *Archives of Microbiology* **136** : 306-311.
- Klopper, J.W. et Schroth, M.N.** (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria in radish. pp 879-882. Proc. 4th Int'l. Conf. Plant Pathogenic Bact. Gilbert-Clarey, Tours, France.
- Knoester, M., Pieterse, C.M.J., Bol, J.F. et Van Loon, L.C.** (1999) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12** : 720-727.
- Koch, E., Meier, B.M., Eiben, H.G. et Slusarenko, A.** (1992) A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiology* **99** : 571-576.
- Kombrick, E. et Somssich, I.E.** (1995) Defense responses of plants in cells surrounding necrotic infection sites. *Advances in Botanical Research* **21** : 1-34
- Kortekamp, A., Wind, R. et Zyprian, E.** (1997) The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two-susceptible *Vitis* cultivars. *Vitis* **36** : 103-104.
- Kortekamp, A.** (2006) Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* **44** : 58-67.
- Koussa, T., Cherrad, M., Zaoui, D. et Broquedis, M.** (1998) Composition and content of fatty acids in *Vitis vinifera* L. var. cabernet sauvignon leaves infected with the eutypiosis fungus, *Eutypa lata*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **32** : 11-16.
- Kraeva, E., Tesnière, C., Terrier, N., Romieu, C., Sauvage, F.X., Bierne, J. et Deloire, A.** (1998) Transcription of a β -1,3-glucanase gene in grape berries in a late developmental period, or earlier after wounding treatments. *Vitis* **37** : 107-111.
- Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Leonova-Erko, E.I., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N.M. et Tikhonovich, I.A.** (2003) Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiology* **72** : 37-41.

- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G. et Merillon, J.-M.** (1999) Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures : methyl jasmonate induction and ¹³C biolabeling. *Journal of Natural Products* **62** : 1688-1690.
- Kuc, J.** (1995) Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* **33** : 275-297.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. et Felix, G.** (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* **16** : 3496-3507.
- Lamb, C. et Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48** : 251-275.
- Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., Hervás, A. et Jiménez-Díaz, R.M.** (2001) Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on suppression of fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* **91** : 807-816.
- Langcake, P. et Pryce, R.J.** (1976) The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as response to infection and injury. *Physiological Plant Pathology* **9** : 77-86.
- Langcake, P. et Pryce, R.J.** (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **33**, 151-152.
- Langcake, P., Cornford, C.A. et Pryce, R.J.** (1979) Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry* **18** : 1025-1027.
- Langcake, P.** (1981) Disease resistance of *Vitis* spp and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* **18** : 213-226.
- Laquittaine, L., Gomès, E., François, J., Marchive, C., Pascal, S., Hamdi, S., Atanassova, R., Delrot, S. et Coutos-Thevenot, P.** (2006). Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea* : Induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19** : 1103-1112.
- Larkin, R.P. et Fravel, D.R.** (1998) Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant disease* **82** : 1022-1028.
- Larkin, R.P. et Fravel, D.R.** (1999) Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology* **89** : 1152-1161.
- Larronde, F., Gaudillère, J.P., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G. et Merillon, J.M.** (2003). Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *American Journal of Enology and Viticulture* **54** : 63-66.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Defago, G. et Haas, D.** (1992) Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** : 1562-1566.
- Laville, J., Voisard, C., Latour, X., Philippot, L., Corberand, T. et Lemanceau, P.** (1999) The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiology Ecology* **30** : 163-170.
- Laxalt, A.M., ter Riet, B., Verdonk, J.C., Parigi, L., Tameling, V.I.L., Vossen, J., Haring, M., Musgrave, A. et Munnik, T.** (2001) Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: rapid and specific expression of LePLD β 1 on elicitation with xylanase. *The Plant Journal* **26** : 237-247.
- Leckband, G. et Lörz, H.** (1998) Transformation and expression of a stilbene gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **96** : 1004-1012.

- Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A. et Lebrun-Garcia, A.** (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13** : 821-829.
- Lee, J., Klessig, D.F. et Nurnberger, T.** (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *The Plant Cell* **13** : 1079-1093.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. et Schippers, B.** (1995) Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* **101** : 655-664.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. et Schippers, B.** (1996) Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **86**: 149-155.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M. et Medegen, K.** (1997) Control of postharvest pathogens and colonization of apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* **87** : 1103-1111.
- Legendre, L., Heinstejn, P.F. et Low, P.S.** (1992) Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *The Journal of Biological Chemistry* **267** : 20140-20147.
- Legendre, L., Yueh, Y.G., Crain, R., Haddock, N., Heinstejn, P.F. et Low, P.S.** (1993) Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plants cell. *The Journal of Biological Chemistry* **288** : 24559-24563.
- Lemanceau, P. et Alabouvette, C.** (1991) Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* **10** : 279-286.
- Lepoivre, P.** (2003) Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire. In: Phytopathologie. Editions De Boeck and Larcier, Bruxelles, pp. 161-191.
- Leroux, P., Chapeland, F., Arnold, A. et Gredt, M.** (2000) New cases of negative cross-resistance between fungicides, including sterol biosynthesis inhibitors. *Journal of General Plant Pathology* **66** : 75-81.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M. et Chapeland, F.** (2002) Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* **58** : 876-888.
- Li, X., Tetling, S., Winkler, U.K., Jaeger, K.E. et Benedik, M.J.** (1995) Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Applied Environmental Microbiology* **61** : 2674-2680.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R. et Hofmann, D.** (2000) Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* **56** : 688-695.
- Lim, H.-S., Kim, Y.-S. et Kim, S.-D.** (1991) *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied Environmental Microbiology* **57** : 510-516.
- Liswidowati, Melchior, F., Hohmann, F., Schwer, B. et Kindl, H.** (1991) Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta* **183** : 307-314.
- Loulakakis, K.A.** (1997) Genomic organization and expression of an osmotin-like gene in *Vitis vinifera* L.. *Vitis* **36** : 157-158.
- Low, P.S. et Merida, J.R.** (1996) The oxidative burst in plant defense : function and signal transduction. *Physiologia Plantarum* **96** : 533-542.

- Lucy, M., Reed, E. et Glick, B.R.** (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86** : 1-25.
- Lutz, M.P., Wenger, S., Maurhofer, M., Défago, G. et Duffy, B.** (2004) Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiology Ecology* **48** : 447-455.
- Maccarrone, M., Van Zadelhoff, G., Veldink, G.A., Vliegenthart, J.F.G. et Finazzi-Agro, A.** (2000) Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *European Journal of Biochemistry* **267** : 5078-5084.
- Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S. and Aziz, A.** (2007) Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* **118** : 43-57.
- Malathi, P., Viswanathan, R., Padmanaban, P., Mohanraj, D. et Ramesh Sundar, A.** (2002) Microbial detoxification of *Colletotrichum falcatum* toxin. *Current Science* **83** : 745-749.
- Manteau, S., Lambert, B., Jeandet, P. et Legendre, L.** (2003) Changes in chitinase and thaumatin-like pathogenesis-related proteins of grape berries during the Champagne winemaking process. *American Journal of Enology and Viticulture* **54** : 267-272.
- Mao, W., Lewis, J.A., Lumsden, R.D. et Hebbar, K.P.** (1998) Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Protection* **17** : 535-542.
- Marchal, R., Tabary, I., Valade, M., Moncomble, D., Viaud L., Robillard, B. et Jeandet, P.** (2001) Effects of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine foaming properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81** : 1371-1378.
- Mari, M., Guizzardi, M., Brunelli, M. et Folchi, A.** (1996) Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* **15** : 699-705.
- Martin, C., Vernoy, R., Carre, M., Vesselle, G., Collas, A. et Bougeray, C.** (1987) Vignes et techniques de culture *in vitro*. Quelques résultats d'une collaboration recherche publique et recherche privée. Bulletin de l'Office international de la vigne et du vin (O.I.V.) **675-676** : 447-458
- Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. et Baccou, J.-C.** (2001) Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology* **127** : 334-344.
- Martinez, F., Dubos, B. et Fermaud, M.** (2005) The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology* **95** : 692-700.
- Masih, E.I. et Paul, B.** (2002) Secretion of β -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology* **44** : 391-395.
- Mathre, D.E., Callan, N.W., Johnston, R.H., Miller, J.B. et Schwend, A.** (1994) Factors influencing the control of *Pythium ultimum*-induced seed decay by seed treatment with *Pseudomonas aureofaciens* AB254. *Crop Protection* **13** : 301-307.
- Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T. et Feussner, I.** (2006) Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry* **67** : 649-657.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. et Boller, T.** (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue : II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* **88** : 936-942.

- Maurhöfer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J.P. et Défago, G.** (1994) Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 : influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* **84** : 139-146.
- Maurhöfer, M., Baehler, E. Notz, R., Martinez, V. and Keel, C.** (2004) Cross talk between 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol pseudomonads on wheat roots. *Applied Environmental Microbiology* **70** : 1990-1998.
- Mauro, M.C.; Toutain, S., Walter, B., Pinck, L., Otten, L., Coutos-Thévenot, P., Deloire, A. et Barbier, P.** (1995) High efficiency regeneration of grapevine plant transformed with the GFLV coat protein gene. *Plant Science* **112** : 97-106.
- Mazzola, M., Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D.M. et Pierson, L.S. III** (1992) Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* **58** : 2616-2624.
- Mazzola, M., Fujimoto, D., Thomashow, L. et Cook, R.** (1995a) Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. *Applied Environmental Microbiology* **61** : 2554-2559.
- Mazzola, M., Stahlman, P.W. et Leach, J.E.** (1995b) Application method affects the distribution and efficacy of rhizobacteria suppressive of downy brome (*Bromus tectorum*). *Soil Biology and Biochemistry* **27** : 1271-1278.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. et Browse, J.** (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **94** : 5473-5477.
- Mehdy, M.C.** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* **105** : 467-472.
- Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F.M. et Peterman, T.K.** (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **101** : 441-450.
- Mène-Saffrané, L., Esquerre-Tugaye, M.-T. et Fournier, J.** (2003) Constitutive expression of an inducible lipoxygenase in transgenic tobacco decreases susceptibility to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Molecular Breeding* **12** : 271-282.
- Metcalf, L.D., Schmitz, A.A. et Pelka, JR.** (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas-chromatographic analysis. *Analytical Chemistry* **38** : 514-515.
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E.R., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. et Inverardi, B.** (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250** : 1004-1006.
- Meyer, A., Pühler, A. et Niehaus, K.** (2001) The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213** : 214-222.
- Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L.C., Höfte, M. et Bakker, P.A.H.M.** (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* **6** : 177-185.
- Meziane, H., Gavriel, S., Ismailov, Z., Chet, I., Chernin, L. et Höfte, M.** (2006). Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biology and Technology* **39** : 125-133.
- Milner, J.L., Raffel, S.J., Lethbridge, B.J. et Handelsman, J.** (1995) Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43** : 685-691.

- Milner, J., Silo-Suh, L., Lee, J., He, H., Clardy, J. et Handelsman, J.** (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Environmental Microbiology* **62** : 3061-3065.
- Molina, A. et Garcia-Olmedo, F.** (1997) Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *The Plant Journal* **12** : 669-675.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B. et Défago, G.** (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria : a preventive and curative biological mechanism. *FEMS Microbiology Ecology* **45** : 71-81.
- Montero, C., Cristescu, S.M., Jiménez, J.B., Orea, J.M., Lintel Hekkert, S.t., Harren, F.J.M. et Gonzalez Urena, A.** (2003) *Trans*-resveratrol and grape resistance. A dynamic study by high-resolution laser-based techniques. *Plant Physiology* **131** : 129-138.
- Montillet, J.-L., Agnel, J.-P., Ponchet, M., Vaillau, F., Roby, D. et Trantapylidès, C.** (2002). Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **40** : 633-639.
- Morandi, M.A.B., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Alfenas, A. et Barbosa, J.G.** (2003) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. *Biological control* **26** : 311-317.
- Morello, J.E., Pierson, E.A. et Pierson III, L.S.** (2004) Negative cross-communication among wheat rhizosphere bacteria: effect on antibiotic production by the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Applied Environmental Microbiology* **70** : 3103-3109.
- Moreno, A.B., Martinez de Pozo, A., Borja, M. et San Segundo, B.** (2003) Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **93** : 1344-1353.
- Morrissey, J.P. et Osbourn, A.E.** (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology* **63** : 708-724.
- M'piga, P., Bélanger, R.R., Paulitz, T.C. et Benhamou, N.** (1997) Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* on tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50** : 301-320.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E. et Zenk, M.H.** (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **90** : 7490-7494.
- Munkvold, G.P. et Marois, J.J.** (1993) Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa dieback*. *Phytopathology* **83** : 624-629. (Résumé)
- Munnik, T., Van Himbergen, J.A.J., ter Riet, B., Braun, F.J., Irvine, R.F., Ven den Ende, H. et Musgrave, A.** (1998) Detailed analysis of the turnover of polyphosphoinositides and phosphatidic acid upon activation of phospholipases C and D in *Chlamydomonas* cells treated with non-permeabilizing concentrations of mastoparan. *Planta* **207** : 133-145.
- Nair, N.G. et Allen, R.N.** (1993) Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycological Research* **97** : 1012-1014.
- Nair, J.R., Singh, G. et Sekar, V.** (2002) Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. *Journal of Applied Microbiology* **93** : 772-780.
- Nakayama, T., Homma, Y., Hashidoko, Y., Mizutani, J. et Tahara, S.** (1999) Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied Environmental Microbiology* **65** : 4334-4339.

- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Raguchander, T. et Samiyappan, R.** (2001) Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry* **32** : 603-612.
- Neilands, J.B.** (1981) Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual Review of Nutrition* **1** : 27-46.
- Newman, M.-A., von Roopenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J. et Dow, J.M.** (2002) Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal* **29** : 487-495.
- Nicot, P.C.** (2002) Lutte biologique avec des micro-organismes contre les maladies aériennes : situation actuelle et perspectives de développement. In : 2^e conférence internationale sur les moyens alternatifs de lutte contre les organismes nuisibles au végétal. Lille 4-7 mars 2002. Communications de la table ronde et des sessions plénières. FREDEC 59, Lille, 28-40
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. et Mosinger, E.** (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal (isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiology* **108** : 17-27.
- Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni et U. et Sorensen, J.** (1999) Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *Journal of Applied Microbiology* **87** : 80-90.
- Nielsen, T.H., Sorensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J.B., Christophersen, C., Givskov M. et Sorensen, J.** (2002) Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Applied Environmental Microbiology* **68** : 3416-3423.
- Nielsen, T.H. et Sorensen, J.** (2003) Production of cyclic lipopeptides by *Pseudomonas fluorescens* strains in bulk soil and in the sugar beet rhizosphere. *Applied Environmental Microbiology* **69** : 861-868.
- Nijssen, C. M.; Visscher, C. A.; Maarse, H.; Willemsens, L. C. et Boehms, M. H.** (1996) *Volatile Compounds in Food*, 7th ed.; TNO Nutrition and Food Research Institute: Zeist, The Netherlands.
- Nishizawa, Y., Saruta, M., Nakazono, K., Nishio, Z., Soma, M., Yoshida, T., Nakajima, E. et Hibi, T.** (2003) Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible β -glucanase gene *GnsI*. *Plant Molecular Biology* **51** : 143-152.
- Notz, R., M., M., Schneider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D. et Défago, G.** (2001) Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology* **91** : 873-881.
- Notz, R., M., M., Dubach, H., Haas, D. et Défago, G.** (2002) Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **69** : 2229-2235.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H. et Boller, T.** (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *Journal of Biological Chemistry* **275** : 7521-7526.
- Nunes, C., Usall, J., Teixido, N. et Vinas, I.** (2001) Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. *International Journal of Food Microbiology* **70** : 53-61.
- Ohme-Takagi, M. et Shinshi, H.** (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell* **7** : 173-182.
- Ohta, H., Shida, K., Peng, Y.-L., Furusawa, I., Shishiyama, J., Aibara, S. et Morita, Y.** (1991) A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiology* **97** : 94-98.

- Okonya, J.F., Kolasa, T. et Miller, M.J.** (1996) Synthesis of fragments of the peptide component of pseudobactin. *Journal of Peptide Science* **2** : 157-164.
- Ongena, M., Daayl, F., Jacques, P., Thonart, P., Benhamou, N., Paulitz, T.C., Cornélis, P., Koedam, N. et Bélanger, R.R.** (1999) Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads : predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathology* **48** : 66-76.
- Ongena, M., Giger, A., Jacques, P., Dommes, J. and Thonart, P.** (2002) Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *European Journal of Plant Pathology* **108** : 187-192.
- Ongena, M., Duby, F., Rossignol, F., Fauconnier, M.-L., Dommes, J. et Thonart, P.** (2004) Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with a systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17** : 1009-1018.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L. et Thonart, P.** (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology* **9** : 1084-1090.
- ONIVINS** (2005). Faits et chiffres 2005. La viticulture dans l'économie nationale. pp 3. (<http://www.onivins.fr/pdfs/statiques/faitschiffres2005-1.pdf>)
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. et Staub, T.** (2001) Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* **107** : 19-28.
- Ortmann, I., Conrath, U. et Moerschbacher, B.M.** (2006) Exopolysaccharides of *Pantoea agglomerans* have different priming and eliciting activities in suspension-cultured cells of monocots and dicots. *FEBS Letters* **580** : 4491-4498.
- Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R. et Singh, C.S.** (2001) Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* **156** : 209-223.
- Palumbo, J.D., Yuen, G.Y., Jochum, C.C., Tatum, K. et Kobayashi, A.** (2005) Mutagenesis of β -1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bispolaris leaf spot of trill fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* **95** : 701-707.
- Park, K.S. et Kloepper, J.W.** (2000) Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria that induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Biological Control* **18** : 2-9.
- Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H. et Ladner, J.E.** (2007) Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **46** : 1821-1828.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L. et Benoît, A.** (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters* **165** : 65-70.
- Paul, B.** (1999a) Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grapevine by an aggressive mycoparasite, *Pythium radiosum*. *FEMS Microbiology Letters* **176** : 25-30.
- Paul, B.** (1999b) *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Letters* **181** : 277-280.
- Paul, B.** (2004) A new species of *Pythium* isolated from burgundian vineyards and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of the grey mould disease. *FEMS Microbiology Letters* **234** : 269-274.
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M. et Broekaert, W.F.** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell* **8** : 2309-2323.

- Percival, D.C., Fisher, K.H. et Sullivan, J.A.** (1994) Use of fruit zone leaf removal with *Vitis vinifera* L. cv. Riesling grapevines. II. Effect on fruit composition, yield, and occurrence of bunch rot (*Botrytis cinerea* Pers. : Fr). *American Journal of Enology and Viticulture* **45** : 133-140.
- Perl, A., Gollop, R., Lipsky, A., Sahar, N., Or, E. et Elyasi, R.** (1996) Regeneration and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology* **2** : 187-193.
- Persmark, M., Expert, D. et Neilands, J.B.** (1992) Ferric iron uptake in *Erwinia chrysanthemi* mediated by chrysobactin and related catechol-type compounds. *Journal of Bacteriology* **174** : 4783-4789.
- Pezet, R., Pont, V. et Hoang-Van, K.** (1992) Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins. Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium 'Recent advances in Botrytis research', Heraklion, Crete, Greece, April 5-10, 1992 Verhoeff, K ; Malathrakis, N E ; Williamson, B (Eds), Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, 87-92.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. et Richter, H.** (2004) Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **43** : 145-148.
- Pierson III, L.S. et Pierson, E.A.** (1996) Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* : role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiology Letters* **136** : 101-108.
- Pierson, E.A., Wood, D.W., Cannon, J.A., Blachere, F.M. et Pierson III, L.S.** (1998a) Interpopulation signaling via N-acyl-homoserine lactones among bacteria in the wheat rhizosphere. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11** : 1078-1084.
- Pierson III, L.S., Wood, D.W., Pierson, E.A. et Chancey, S.T.** (1998b) N-acyl-homoserine lactone-mediated gene regulation in biological control by fluorescent pseudomonads : Current knowledge and future work. *European Journal of Plant Pathology* **104** : 1-9.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. et Van Loon, L.C.** (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independant of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* **8** : 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. and Van Loon, L.C.** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10** : 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchman, S., Mueller, M.J., Bucchala, A.J., Métraux, J.P. et Van Loon, L.C.** (2000) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57** : 123-134.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P.A.H.M. et Van Loon, L.C.** (2001) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance : triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology* **107** : 51-61.
- Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Ton, J., Van Pelt, J.A. et Van Loon, L.C.** (2002) Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **4** : 535-544.
- Pillay, V.K. et Nowak, J.** (1997) Inoculum density, temperature and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic colonization of tomato (*Lycopersicon seculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* **43** : 354-361.
- Ping, L. et Boland, W.** (2004) Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **9** : 263-266.
- Pleban, S., Ingel, F. et Chet, I.** (1995) Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology* **101** : 665-672.

- Pleban, S., Chernin, L. et Chet, I.** (1997) Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* **25** : 284-288.
- Pocock, K.F., Hayasaka, Y., McCarthy, M.G. et Waters, E.J.** (2000) Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** : 1637-1643.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P. et Pugin, A.** (2003) The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** : 553-564.
- Postma, J., Hok-A-Hin, C.H. et Van Veen, J.A.** (1990) Role of microniches in protecting introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* against competition and predation in soil. *Applied Environmental Microbiology* **56** : 495-502.
- Potin, P., Bouarab, K., Kupper, F. et Kloareg, B.** (1999) Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology* **2** : 276-283.
- Press, C.M., Wilson, C., Tuzun, S. et Kloepper, J.W.** (1997) Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10** : 761-768
- Preston, G.M.** (2004) Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **359** : 907-918.
- Punja, Z.K. et Zhang, Y.-Y.** (1993) Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* **25** : 526-540.
- Punja, Z.K. et Utkhede, R.S.** (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology* **21** : 400-407.
- Pusey, P.L.** (1989) Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as biofungicides. *Pesticide Science* **27** : 133-140.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., Van der Sluis, I., Schippers, B. et Bakker, P.A.H.M.** (1995) Dose-reponse relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **85** : 1075-1081.
- Raaijmakers, J.M. et Weller, D.M.** (1998) Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11** : 144-152.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. et De Souza, J.T.** (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* **81** : 537-547.
- Rabéa, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G. et Steurbaut, W.** (2003) Chitosan as antimicrobial agent : Applications and mode of action. *Biomacromolecules* **4** : 1457-1465.
- Rabosto, X., Carrau, M., Paz, A., Boido, E., Dellacassa, E. et Carrau, F.** (2006) Grapes and vineyard soils as microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture* **57** : 332-338.
- Rajnachapel-Messai, J.** (1988) Cellules végétales en quête de métabolites. *Biofutur* **70** : 23-34.
- Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. et Samiyappan, R.** (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* **20** : 1-11.

- Rancé, I., Fournier, J. et Esquerré-Tugayé, M.-T.** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **95** : 6554-6559.
- Raupach, G.S. et Kloepper, J.W.** (1998) Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* **88** : 1158-1164.
- Ravensberg, W. et Elad, Y.** (2002) The reality- a commercial perspective to plant disease biocontrol. *IOBC/WPRS Bulletin* **25** : 125-130
- Reitz, M., Rudolph, K., Schröder, I., S., H.-H., Hallman, J. et Sikora, R.A.** (2000) Lipopolysaccharides of *Rhizoctonia etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied and Environmental Microbiology* **66** : 3515-3518.
- Renault, A.-S., Deloire, A. et Bierne, J.** (1996) Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis* **35** : 49-52.
- Renault, A.S., Deloire, A., Letinois, L., Kraeva, E., Tesnière, C., Ageorges, A., Redon, C. et Bierne, J.** (2000) β -1,3-glucanase gene expression in grapevine leaves as a response to infection with *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture* **51** : 81-87.
- Repka, V., Kubikova, J. et Fischerova, I.** (2000) Immunodetection of PR1-like proteins in grapevine leaves infected with *Oidium tuckeri* and in elicited suspension cell cultures. *Vitis* **39** : 81-87.
- Repka, V.** (2001a) Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biologia Plantarum* **44** : 555-565.
- Repka, V., Fischerova, I. et Silharova, K.** (2001b) Methyl jasmonate induces a hypersensitive-like response of grapevine in the absence of avirulent pathogens. *Vitis* **40** : 5-10.
- Reuveni, M.** (1998a) Relationship between leaf age, peroxidase and β -1,3-glucanase activity, and resistance to downy mildew in grapevines. *Journal of Phytopathology*. 146 : 525-530.
- Reuveni, R. et Reuveni, M.** (1998b) Foliar-fertilizer therapy - a concept in integrated pest management. *Crop Protection* **17** : 111-118.
- Reuveni, M., Zahavi, T. et Cohen, L.** (2001) Controlling of downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with β -aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica* **29** : 125-133.
- Rey, M., Delgado-Jarana, J. et Benitez, T.** (2001) Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. *Applied Microbiology Biotechnology* **55** : 604-608.
- Reymond, P., Grunberger, S., Paul, K., Muller, M. et Farmer, E.** (1995) Oligogalacturonide defense signals in plants : large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **92** : 4145-4149.
- Riches, D. et Holmes, R.** (2005). Control of downy mildew of grapevines by boosting their natural defence system (Victoria: Australian government : Grape and Research and Development Corporation, Department of Primary Industries, project number : DNR 02/05), pp 36.
- Ricker, K.E. et Bostock, R.M.** (1994) Eicosanoids on the *Phytophthora infestans*-potato interactions : lipoxygenase metabolism of arachidonic acid and biological activities of selected lipoxygenase products. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44** : 65-80.
- Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thevenot, P., Boulay, M., Buffard, D. et Esnault, R.** (2001) Molecular characterization of the incompatible interaction of vitis vinifera leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi* : expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *European Journal of Plant Pathology* **107** : 249-261.

- Robert, N., Roche, K., Lebeau, Y., Breda, C., Boulay, M., Esnault, R. et Buffard, D.** (2002) Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected fungal or bacterial pathogens. *Plant Science* **162** : 389-400.
- Roberts, D.P., Lohrke, S.M., Meyer, S.L.F., Buyer, J.S., Bowers, J.H., Baker, C.J., Li, W., de Souza, J.T., Lewis, J.A. et Chung, S.** (2005) Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection* **24** : 141-155.
- Robinson, S.P., Jacobs, A.K. et Dry, I.B.** (1997) A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology* **114** : 771-778.
- Rodgers, P.B.** (1989). Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide Science* **27** : 155-164.
- Rohini, V.K. et Sankara Rao, K.** (2001) Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene : variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Science* **160** : 889-898.
- Romeis, T., Piedras, P. et Jones, J.D.G.** (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *The Plant Cell* **12** : 803-816.
- Romero-Perez, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., Andres-Lacueva, C. et de la Torre-Boronat, M.C.** (2001) 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 Food and Chemistry* **49** : 210-215.
- Rosslenbroich, H.-J. et Stuebler, D.** (2000) *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* **19** : 557-561.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A.G., Sanz, C., Stormann, K., Rosahl, S. et Sanchez-Serrano, J.J.** (1996) Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *Journal of Biological Chemistry* **271** : 21012-21019.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y. et Hunt, M.D.** (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **8** : 1809-1819.
- Ryu, S.B. et Wang, X.** (1998). Increase in free linolenic and linoleic acids associated with phospholipase D-mediated hydrolysis of phospholipids in wounded castor bean leaves. *Biochimica and Biophysica Acta* **1393** : 193-202.
- Ryu, C.-M., Hu, C.-H., Reddy, M.S. et Kloepper, J.W.** (2003) Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist* **160** : 413-420.
- Ryu, C.-M., Farag, M.A., Hu, C.-H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. et Pare, P.W.** (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134** : 1017-1026.
- Sailaja, P.R., Podile, A.R. et Reddanna, P.** (1997) Biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF1 rapidly induces lipoxygenase in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared to crown rot pathogen *Aspergillus niger*. *European Journal of Plant Pathology* **104** : 125-132.
- Saligkarias, I.D., Gravanis, F.T. et Epton, H.A.S.** (2002) Control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US7 and *Candida oleophila* strains I-182 : I . in vivo studies. *Biological Control* **25** : 143-150.
- Salzman, R.A., Tikhonova, B.P., Bordelon, B.P., Hasegawa, P.M. et Bressan, R.A.** (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology* **117** : 465-472.
- Sang, Y., Cui, D. et Wang, X.** (2001) Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126** : 1449-1458.

- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D. et Sanz de Tosetti, M.I.** (2005) Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvested Biology and Technology* **35** : 245-251.
- Sarig, P., Zutkhi, Y., Monjauze, A., Lisker, N. et Ben-Arie, R.** (1997) Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50** : 337-347.
- Schaefer, S.C., Gasic, K., Cammue, B., Broekaert, W., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J. et Korban, S.S.** (2005) Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta* : 1-9.
- Schippers, B., Bakker, A.W. et Bakker, P.A.H.M.** (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* **25** : 339-358.
- Schisler, D.A.** (1997) Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot potatoes. *Phytopathology* **87** : 177-183.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U et Boller, T.** (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324** : 365-367.
- Schmidt, C.S., Lorenz, D., Wolf, G.A. et Jager, J.** (2001) Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* II: Influence of formulation additives and transposon mutagenesis on the antagonistic activity of *Bacillus subtilis* and *Erwinia herbicola*. *Journal of Phytopathology* **149** : 437-445.
- Schmidt, C.S., Agostini, F., Killham, K.K. et Mullins, C.E.** (2004) Influence of soil temperature and matrix potential on sugar beet seedling colonization and suppression of *Pythium* damping-off by the antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* **94** : 351-363.
- Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., Reimmann, C., Notz, R., Défago, G., Haas, D. et Keel, C.** (2000) Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and polyuteorin. *Journal of Bacteriology* **182** : 1215-1225.
- Sela-Buurlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, A., Melchers, L.S., Van den Elzen, P.J.M. et Cornelissen, J.C.** (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* **101** : 857-863.
- Seo, H.S., Song, J.T., cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D.** (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase : a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **98** : 4788-4793.
- Sessitsch, A., Reiter, B. et Berg, G.** (2004) Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* **50** : 239-249.
- Sharma, V.K. et Nowak, J.** (1998) Enhancement of *Verticillium* wilt resistance by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Canadian Journal of Microbiology* **44** : 528-536.
- Shoresh, M., Yedidia, I. et Chet, I.** (2005) Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* **95** : 76-84.
- Siddiqui, I.A. et Shaukat, S.S.** (2002) Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. *Biology and Fertility of Soils* **36** : 260-268.
- Siedow, J.N.** (1991) Plant lipoxygenase : structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42** : 145-188.

- Silva, H.S.A., Romeiro, R.S., Marcagnan, D., Halfed-Vieira, B.A., Pereira, M.C.B. et Mounteer, A.** (2004) Rhizobacteria induction of systemic resistance in tomato plants : non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control* **29** : 288-295.
- Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. et Chung, Y.R.** (1999) Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* **89** : 92-99.
- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E.J., Midland, S.L., Sims, J.J. et Keen, N.T.** (1998) Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiology* **116** : 231-238.
- Someya, N., Nakajima, M., Hirayae, K., Hibi, T. et Akutsu, K.** (2001) Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology* **67** : 312-317.
- Staples, R.C. et Mayer, A.M.** (1995) Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiology Letters* **134** : 1-7.
- Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., Hänßler, G., Mühlbach, H.P. et Thomzik, J.E.** (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* **16** : 668-673.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. et Fritig, B.** (1993) Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75** : 687-706.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D. et Loper, J.E.** (2002) Antibiosis contributes to biological control of the fire blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology* **92** : 1202-1209.
- Strigul, N.S. et Kravchenko, L.V.** (2006) Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environmental Modelling and Software* **21** : 1158-1171.
- Szczecz, M. et Shoda, M.** (2004) Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* **152** : 549-556.
- Taguchi, F., Shimizu, R., Nakajima, R., Toyoda, K., Shiraishi, T. et Ichinose, Y.** (2003) Differential effects of flagellin from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, tomato and *glycinea* on plant defense response. *Plant Physiology and Biochemistry* **41** : 165-174.
- Tanaka, Y., Kojima, M. et Uritani, I.** (1974) Properties, development, and cellular-localization of cinnamic acid and 4-hydroxylase in cut-injured sweet potato. *Plant and Cell Physiology* **15** : 843-854.
- Tanaka, N., Che, F.-S., Watanabe, T., Fujiwara, S., Takayama, S. et Isogai, A.** (2003) Flagellin from an incompatible *Acidovorax avenae* mediates H₂O₂ generation accompanying hypersensitive cell death and expression of PAL, Cht-1, but not of LOX in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** : 422-428.
- Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A.J., Perry, B. et Bagni, N.** (2005) Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist* **166** : 895-905.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A. et Lamb, C.** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **91** : 4158-4163.
- Terras, F., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., Leuven, F.V., Vanderleyden, J., Cammue, B. et Broekaert, W.F.** (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish : their role in host defense. *The Plant Cell* **7** : 573-588.
- Thangavelu, R., Palaniswami, A., Ramakrishnan, G., Doraiswamy, S., Muthukrishnan, S. et Velazhahan, R.** (2001) Involvement of fusaric acid detoxification by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf10 in the biological

control of *Fusarium* wilt of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Plant Diseases and Protection* **108** : 433-445.

Thrane, C., Nielsen, T.H., Nielsen, M.N., Sorensen, J. et Olsson, S. (2000) Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **33** : 139-146.

Timmusk, S. et Wagner, E.G.H. (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression : a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12** : 951-959.

Tjamos, S.E., Flementakis, E, Paplomatas, E.J. et Katinakis, P. (2005) Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18** : 555-561.

Ton, J., Davison, S., Van Wees, S.C.M., Van Loon, L.C. et Pieterse, C.M.J. (2001) The *Arabidopsis ISR1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiology* **125** : 652-661.

Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. et Thonart, P. (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology* **96** : 1151-1160.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. et Aziz, A. (2006) Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **114** : 405-413.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. et Aziz, A. (2007) Characterization of new strains of native bacteria that protect grapevine leaves against *Botrytis cinerea* and induce plant defense reaction. In "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, fundamental and practical approaches to increase biocontrol efficacy" Ed. Y. Elad, Y., Ongena, M., Höfte, M. et Jijakli, H. IOBC/wprs Bulletin **30**: 377-381

Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D. et Dessaux, Y. (2003) Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* **149** : 1981-1989.

Urwin, P.E., McPherson, M.J. et Atkinson, H.J. (1998) Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* **204** : 472-479.

Utkhede, R., Bogdanoff, C. et McNevin, J. (2001) Effects of biological and chemical treatments on *Botrytis* stem canker and fruit yield of tomato under greenhouse conditions. *Canadian Journal of Plant Pathology* **23** : 253-259.

Valueva, T.A. et Mosolov, V.V. (2004) Role of inhibitors proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* **69** : 1305-1309.

Van den Broek, D., Chin-A-Woeng, T.F.C., Eijkemans, K., Mulders, I.H.M., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. (2003). Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16** : 1003-1012.

Van der Luit, A.H., Piatti, T., Van Doorn, A., Musgrave, A., Felix, G., Boller, T. et Munnik, T. (2000) Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiology* **123** : 1507-1516.

Van Hulten, M., Pelser, M., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. et Ton, J. (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **103** : 5602-5607.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. et Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36** : 453-483.

- Van Loon, L.C. et Van Strien, E.A.** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Pathology* **55** : 85-97.
- Van Loon, L.C., Geraats, B.P.J. et Linthorst, H.J.M.** (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* **11** : 184-191.
- Van Peer, R., Niermann, G.J. et Schippers, B.** (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas fluorescens* strains WCS417r. *Phytopathology* **81** : 728-734.
- Van Rij, E.T., Wesselink, M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V. et Lugtenberg, B.J.J.** (2004) Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17** : 557-566.
- Van Veen, J., Van Overbeek, L. et Van Elsas, J.** (1997) Fate and activity of micro-organisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61** : 121-135.
- Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y.A.M., Hartog, F. et Van Loon, L.C.** (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10** : 716-724.
- Van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., Van Loon, L.C. et Pieterse, C.M.J.** (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* **41** : 537-549.
- Vaughn, S.F. et Gardner, H.W.** (1993) Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic of soybean. *Journal of Chemistry Ecology* **19** : 2337-2345.
- Vera-Estrella, R., Higgins, V.J. et Blumwald, E.** (1994) Plant defense response to fungal pathogens. II : G-proteins mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiology* **106** : 97-102.
- Verhagen, B., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.-S., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J.** (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17** : 895-908.
- Véronési, C., Rickauer, M., Fournier, J., Pouénat, M.-L. et Esquerré-Tuyagé, M.-T.** (1996) Lipoxygenase gene expression in the tobacco-*Phytophthora parasitica* nicotianae interaction. *Plant Physiology* **112** : 997-1004.
- Viehweger, K., Dordschbal, B. et Roos, W.** (2002) Elicitor-activated phospholipase A₂ generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H⁺ pool for pH signaling via the activation of Na⁺-dependent proton fluxes. *The Plant Cell* **14** : 1509-1520.
- Vigne, E., Komar, V. et Fuchs, M.** (2004) Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research* **13** : 165-179.
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J. et Browse, J.** (1998) A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **95** : 7209-7214.
- Vörös, K., Feussner, I., Kuhn, H., Lee, J., Graner, A., Lobler, M., Parthier, B. et Wasternack, C.** (1998) Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenase from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. *European Journal of Biochemistry* **251** : 36-44.
- Walker, R., Ferguson, C.M.J., Booth, N.A. et Allan, E.J.** (2002) The symbiosis of *Bacillus subtilis* L-forms with Chinese cabbage seedlings inhibits conidial germination of *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology* **34** : 42-45.
- Wang, C., Chin, C.-K. et Chen, A.** (1998) Expression of the yeast Δ-9 desaturase gene in tomato enhances its resistance to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52** : 371-383.

- Wang, Y., Ohara, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y. et Mayama, S.** (2005) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18** : 385-396.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P. et Ryals, J.A.** (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* **3** : 1085-1094.
- Weber, H., Chételat, A. Calderi, D. et Farmer, E.E.** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *The Plant Cell* **11** : 485-493.
- Weber, H.** (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* **7** : 217-224.
- Wei, G., Kloepper, J.W. et Tuzun, S.** (1991) Induction of systemic resistance in cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **81** : 1508-1512.
- Wei, G., Kloepper, J.W. et Tuzun, S.** (1996) Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* **86** : 221-224.
- Weller D. M.** (1988) Bacterial control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **26** : 379-407.
- Whipps, J.M.** (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52** : 487-511.
- Whiteman, S.A. et Stewart, A.** (1998) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation on irradiated grape leaf tissue by the antagonistic bacterium *Serratia liquefaciens*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **26** : 325-330.
- Woo, S., Fogliano, V., Scala, F. et Lorito, M.** (2002) Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie van Leeuwenhoek* **81** : 353-356.
- Wright, D.A., Killham, K., Glover, L.A. et Prosser, J.I.** (1995) Role of pore size location in determining bacterial activity during predation by protozoa in soil. *Applied Environmental Microbiology* **61** : 3537-3543.
- Wright, S.A.I., Zumoff, C.H., Schneider, L. et Beer, S.V.** (2001) *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Applied Environmental Microbiology* **67**: 284-292
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Leon, J., Fitzsimmons, K.C., Levine, E.B., Raskin, I. et Shah, D.M.** (1997) Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology* **115** : 427-435.
- Xing, J. et Chin, C.-K.** (2000) Modification of fatty acids in eggplant affects its resistance to *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Pathology* **156** : 217-225.
- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. et Bressan, R.A.** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *The Plant Cell* **6** : 1077-1085.
- Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, S. et Matsuta, N.** (2000) Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* **19** : 639-646.
- Yan, Z., Reddy, A.S.N., Ryu, C.-M., McInroy, J.A., Wilson, M. et Kloepper, J.W.** (2002) Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **92** : 1329-1333.
- Yan, Z., Reddy, M.S. et Kloepper, J.W.** (2003) Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. *Canadian Journal of Microbiology* **49** : 383-389.

- Yuan, H., Ming, X., Wang L., Hu, P., An, C. et Chen, Z.** (2002) Expression of a gene encoding trichosanthin in transgenic rice plants enhances resistance to fungus blast disease. *Plant Cell Reports* **20** : 992-998.
- Yun, D.-J., D'Urzo, M.P., Abad, L., Takeda, S., Salzman, R.A., Chen, Z., Lee, H., Hasegawa, P.M. et Bressan, R.A.** (1996) Novel osmotically induced antifungal chitinases and bacterial expression of an active recombinant isoform. *Plant Physiology* **111** : 1219-1225.
- Zablutowicz, R.M., Press, C.M., Lying, N., Brown, G.L. et Kloepper, J.W.** (1992) Compatibility of plant growth promoting rhizobacterial strains with agrichemical applied to seed. *Canadian Journal of Microbiology* **38** : 45-50.
- Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutki, J., Ben-Arie, R. et Droby, S.** (2000) Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvested Biology and Technology* **20** : 115-124.
- Zdor, R.E. et Anderson, A.J.** (1992) Influence of root colonizing bacteria on the defence responses in bean. *Plant Soil* **140** : 99-107.
- Zhang, S. et Klessig, D.F.** (2001) MAPK cascades in plant defense signalling. *Trends in Plant Science* **6** : 520-527.
- Zhao, J., Guo, Y.-Q., Kosaihiro, A. et Sakai, K.** (2004) Rapid accumulation and metabolism of polyphosphoinositol and its possible role in phytoalexin biosynthesis in yeast elicitor-treated *Cupressus lusitanica* cell cultures. *Planta* **219** : 121-131.
- Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I.** (1996) Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* **86** : 1255-1260.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Metraux, J.-P. et Mauch-Mani, B.** (2000) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **97** : 12920-12925.
- Zimmerli, L., Metraux, J.-P. et Mauch-Mani, B.** (2001) β -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **126** : 517-523.
- Zimmermann, S., Ehrhardt, T., Plesh, G. et Müller-Röber, B.** (1999) Ion channels in plant signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55** : 183-203.