



Stimulation des mécanismes de défenses naturelles des plantes

Protection des cultures, production de composés secondaires d'intérêt



**Terres
d'Innovation**

Stimulation des mécanismes de défenses naturelles des plantes

Protection des cultures, production de composés secondaires d'intérêt



iteipmai



© Terres d'Innovation • avril 2009
Terres d'Innovation • 44 rue d'Alésia 75682 Paris Cedex 14
<http://www.terres-innovation.fr>
Rédaction : Joséphine Piasentin • Terres d'Innovation
Maquette et mise en page : Catherine Le Van Van • Astredhor
Photo de couverture : ©Astredhor

Préface

J'ai le plaisir de rédiger la préface de cette nouvelle publication, des "synthèses bibliographiques" de Terres d'innovation, qui ont pour objectif de répondre, sur des sujets variés, aux besoins de ses membres, tout en restant accessibles à un public plus varié.

Cette première synthèse concerne la stimulation des défenses naturelles des plantes et l'élicitation de voies du métabolisme secondaire des plantes, métabolisme particulièrement important pour les plantes dont s'occupe l'iteipmai, les plantes à parfum, aromatiques et médicinales. Les "actifs" des plantes (qu'ils s'agissent d'actifs aromatiques, médicinaux, cosmétiques, ...) sont en effet bien souvent impliqués dans les processus de défense naturelle des plantes.

Ce document fait le point des connaissances sur ce sujet et en fait ressortir l'intérêt très prometteur pour l'avenir où les préoccupations environnementales sont au premier plan.

Si notre objectif est de réduire la consommation de produits phytosanitaires dans la protection des cultures, comment mettre en œuvre des techniques qui stimuleraient la plante pour qu'elle développe son propre système de défense ?

Cette synthèse est, à elle seule, la préface de ce champ de recherche tout à fait prometteur et susceptible d'intéresser de nombreuses filières végétales.

Nadine Leduc

Présidente de l'iteipmai (1)

(1) institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, aromatiques et médicinales

Remerciements

Nous tenons à remercier les différentes personnes qui ont contribué à la réalisation de ce document et nous voudrions citer en particulier :

- Monsieur Frédéric Bourgaud, Professeur des Universités à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de Nancy (ENSAIA) et chercheur à l'INRA sur les métabolites secondaires végétaux, et Monsieur Emmanuel Pajot, chargé de projets en pathologie végétale au sein du centre d'innovation et de transfert de technologie Valinov, pour leur lecture du document et les suggestions et compléments d'information qu'ils ont apportés,
- Monsieur Manierski, chef produit grandes cultures chez Goëmar, Monsieur Delpech de la société Soft, ainsi que le service technique de Syngenta pour avoir bien voulu faire partager leur expérience,
- Merci enfin aux auteurs des différentes figures présentées dans le document, Dr. N. Benhamou, Dr. K. Shetty, Dr. J. Zhao et Dr. P. Facchini, de nous avoir autorisés à les utiliser.

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	11	◀
RAPPELS SUR LES MÉCANISMES DE DÉFENSES NATURELLES DES PLANTES	13	◀
1. Défenses face aux stress environnementaux	13	◀
2. Deux types de reconnaissance lors d'attaque de pathogène	12	▼
2.1 Reconnaissance gène pour gène	14	
2.2 Reconnaissance d'éliciteurs généraux	14	
3. Les bouleversements chimiques déclenchés suite à une agression	14	▼
3.1 Les premiers évènements déclenchés	15	
3.2 La synthèse de premières hormones signal (Zhao <i>et al.</i> 2005)	15	
3.3 Synthèse de composés protégeant et défendant la plante	17	
4. Une réponse locale plus ou moins sévère et l'acquisition d'une protection systémique	19	▼
4.1 Réaction hypersensible, réponse rapide	19	
4.2 Résistances locale et systémique acquises	19	
5. Un nouveau mode de lutte reposant sur ces mécanismes naturels	20	◀
6. La synthèse de composés du métabolisme secondaire	20	◀
L'APPLICATION DE SDN - STIMULATEURS DE DÉFENSES NATURELLES	21	◀
1. Deux types de molécules et deux types d'élicitation	21	▼
1.1 De la simulation d'une attaque à la stimulation des voies de signalisation	21	
1.2 Elicitation directe ou potentialisation de la plante	21	
2. Molécules d'origine animale et fongique	22	▼
2.1 Le chitosan, polysaccharide dérivé de la chitine	22	
2.2 L'acide cholique (Koga, Kubota <i>et al.</i> 2006)	24	
2.3 Utilisation de formes avirulentes de champignons pathogènes	25	
2.4 Application d'un extrait saccharidique d' <i>Aspergillus niger</i> (Hindumathy <i>et al.</i> 2006)	25	
2.5 Protéines issues du genre <i>Phytophthora</i>	26	
2.6 Les flagellines	26	
3. L'utilisation de bactéries et composés bactériens	27	▼
3.1 Application de protéines bactériennes : les harpines	27	
3.2 Déclenchement des mécanismes de défense par <i>Pseudomonas</i> (Murugan & Dhandapani, 2006)	28	

4. Les SDN à base d'extraits de plantes	29 ▼
4.1 L'extrait de fenugrec	29
4.2 L'extrait de renouée de Sakhaline	30
4.3. Essais de stimulation des défenses à partir d'autres plantes	31
5. Les préparations à base d'algues	32 ▼
5.1 La laminarine, oligosaccharide issu des algues brunes	32
5.2 Le TTF5, cocktail d'extraits d'algues, de fertilisants et d'acides aminés (Pajot, Maurice et al. 2007)	34
6. Les SDN synthétiques	34 ▼
6.1 L'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA)	34
6.2 L'ASM, acibenzolar-S-méthyl	35
6.3 Le BABA (Acide Beta Amino-Butyrique)	38
6.4 L'Acide jasmonique et son méthyle	40
6.5 Le Cis-jasmonate contre les insectes suceurs-piqueurs (Pickett <i>et al.</i> 2007)	42
6.6 La coronatine et son homologue synthétique : la coronalone (Schüler <i>et al.</i> 2004)	42
7. Les éléments minéraux	43 ▼
7.1 Le monosilicate de potassium et le phosphite de potassium	43
7.2 Le phosétyl-aluminium	43
8. Lutte contre les stress abiotiques	44 ▼
8.1 Lutte contre les stress hydriques	44
8.2 Résistance face au gel	44
8.3 Amélioration de la thermotolérance	45
8.4 Lutte contre les carences minérales	46
9. L'apparition de résistantes est très improbable	46 ▼
10. L'implantation des SDN sur le marché français	47 ▼
10.1 Un contexte réglementaire peu adapté	47
10.2 Les premiers pas des SDN homologués en France	48
11. Conclusion sur les stimulateurs de défenses naturelles	49 ▼
LA PRODUCTION DE MÉTABOLITES SECONDAIRES PAR ÉLICITATION	51
1. Production de composés phénoliques	52 ▼
1.1 La production d'acide rosmarinique	52
1.2 Production élicitée de flavonoïdes	58
1.3 Synthèse de xanthones et flavones	59
1.4 Production d'hypericine et hyperforine	61
1.5 Elicitation par des extraits de plante riches en phénols	63
1.6 Conclusion sur l'élicitation des voies de synthèse des composés phénoliques	64
2. Production de composés terpéniques	65 ▼
2.1 Elicitation de la tanshinone, diterpène	65
2.2 Production d'un triterpénoïde à des fins phytosanitaires : l'azadirachtine	66
2.3 Synthèse de saponines terpéniques cycliques	67

2.4 Elicitation de la voie des diacétylènes et de la synthèse d'éthers spiroketal-enol	68
2.5 Conclusion sur l'élicitation des voies des terpènes	70
3. Synthèse d'alcaloïdes	71 ▼
3.1 Caractérisation de la voie de biosynthèse des alcaloïdes	71
3.2 Elicitation de cellules d'opium pour la production de sanguinarine	71
4. Elicitations <i>in vivo</i>	72 ▼
4.1 Application de chitosan sur une culture de basilic en pot	72
4.2 Stress abiotique sur matricaire <i>in vivo</i> en conditions contrôlées	73
5. Conclusion sur l'élicitation des voies métaboliques secondaires	74 ◀
Liste des abréviations	75 ◀
Liste des tableaux et figures	76 ◀
Masse molaire des différentes molécules testées en tant qu'éliciteurs	77 ◀
Références citées dans le chapitre « Rappels sur les mécanismes de défenses naturelles des plantes »	78 ◀
Références citées dans le chapitre « L'application de stimulateurs de défenses naturelles »	80 ◀
Références citées dans le chapitre « La production de métabolites secondaires par élicitation »	84 ◀

Introduction générale

Depuis la fin des années 1990, une nouvelle stratégie de protection préventive des plantes a émergé et fait l'objet de nombreuses études en France et dans le monde. Elle consiste en des applications foliaires ou racinaires de substances capables de stimuler les réponses de défenses naturelles des plantes.

Cette stratégie se base sur les grands principes des interactions plante-agresseur. En effet, il est maintenant connu que la plante est capable de reconnaître des agresseurs potentiels par l'intermédiaire d'un phénomène de reconnaissance moléculaire et d'établir une réponse de défense face à cet assaillant.

Les molécules possédant la propriété d'induire au sein de la plante une cascade de réactions de défense sont nommées « éliciteurs » (du verbe anglais « to elicit » : déclencher).

Les chercheurs ont donc entrepris un travail sur ces éliciteurs afin de détecter des molécules mimant une agression et permettant ainsi aux plantes d'être protégées face aux attaques éventuelles d'agents pathogènes ou de ravageurs. Cette notion peut être élargie au fait que ces élicitations représentent également un bon moyen pour les plantes de se protéger face à des stress environnementaux.

Or, afin de pouvoir explorer la piste d'utilisation de ces éliciteurs encore appelés stimulateurs de défenses naturelles (SDN), il est important de bien comprendre tous les mécanismes déclenchés au sein de la plante qui sont à l'origine du phénomène de protection. En effet, la perception d'un éliciteur par une plante déclenche différentes voies de signalisation : flux d'ions, burst oxydatif et synthèse de molécules de signal. Des gènes de défense sont ainsi induits et mènent au renforcement des parois cellulaires, à la synthèse de protéines ayant une activité inhibitrice ou hydrolytique envers les agresseurs et à l'accumulation de métabolites secondaires comme les phytoalexines aux propriétés antimicrobiennes. Les métabolites secondaires représentent toutes molécules qui ne sont pas directement impliquées dans les processus de croissance d'un végétal à la différence des métabolites primaires qui interviennent dans le métabolisme de base.

Ces processus déclenchent également la synthèse de métabolites secondaires détenant un rôle plus ou moins clair dans le système de défense mais qui sont parfois des substances à fort intérêt industriel. L'autre domaine d'utilisation des éliciteurs serait donc celui de la stimulation des voies métaboliques secondaires afin de produire en quantité importante des composés pourvus de propriétés alimentaires, cosmétiques, thérapeutiques ou pharmacologiques.

Ce présent document établit l'état des lieux des recherches effectuées sur les mécanismes de défenses naturelles et sur l'élicitation de ces mécanismes. Il est divisé en trois parties.

La première partie fait état des connaissances portant sur le déroulement de l'acquisition de défenses naturelles par les plantes en reprenant les différentes étapes de la mise en place de l'arsenal de défense d'une plante vis-à-vis d'une agression.

Ensuite, la deuxième partie porte sur l'utilisation d'éliciteurs en tant que stimulateurs de défenses naturelles. Ces SDN sont présentés en fonction de leur nature, à savoir animale, fongique, bactérienne, végétale ou synthétique. Les résultats obtenus pour chacun des SDN testés sont commentés. Des données concernant les éliciteurs intervenant lors de stress environnemental sont également apportées. A la fin de la partie, un récapitulatif sur l'intérêt potentiel des différents SDN est dressé.

Enfin, la troisième partie fait la synthèse des différents travaux menés sur l'élicitation des voies métaboliques secondaires en fonction de l'appartenance des métabolites visés aux principaux groupes chimiques répertoriés, c'est-à-dire les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Pour chaque classe de métabolites, un tableau-résumé est établi sur les performances des différents éliciteurs testés.

Cette synthèse est complétée par des documents annexes, à savoir, la liste des abréviations ainsi que la liste des figures et tableaux et enfin un tableau précisant la masse molaire des molécules évaluées sur leurs propriétés élicitrices afin que le lecteur puisse rapporter chaque donnée, exprimée en mol/l (M) dans le document, en g/l.

Rappels sur les mécanismes de défenses naturelles des plantes

Une plante dans son environnement est continuellement soumise à diverses agressions biotiques (agents pathogènes) ou abiotiques (stress hydrique, thermique, chimique). Bien que dépourvue de système immunitaire évolué, chaque plante n'est sensible qu'à quelques uns des multiples agresseurs éventuels (Pajot, 2005b). Elle possède en effet des barrières mécaniques (ex : couche de cire) et chimiques (ex : métabolites antimicrobiens) qui la protègent (Nürnberg *et al.*, 2004 et 2005).

En premier lieu, la plante dispose d'une barrière physiologique représentée par exemple par la cuticule, les tissus riches en lignine, les tissus pubescents, etc.

En second lieu, des stress environnementaux sont interprétés comme des signaux qui induisent la mise en place d'un système de protection par la plante. D'autres stress ont une origine biotique : lors d'une agression par un pathogène, la plante et cet organisme étranger échangent des signaux moléculaires. Les agents pathogènes produisent des substances toxiques qui sont reçues et identifiées par la plante hôte. Parfois même, la plante reconnaît certains éléments structuraux du pathogène comme par exemple les éléments constitutifs de sa paroi.

Ces stress environnementaux et substances provenant des pathogènes ou de la plante elle-même sont appelés *éliciteurs* car, sous leur influence, la plante produit des substances spécifiques qui transmettent l'information d'attaque et qui permettent de déclencher en son sein le processus de défense.

Autrement dit, un *éliciteur* correspond à toute substance ou stress qui déclenche une réponse physiologique et morphologique, et l'accumulation, entre autres, de phytoalexines (métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes) dans une plante (Zhao *et al.*, 2005).

Cette notion d'élicitation a été introduite dans les années 1975-1980 (dans Radman *et al.* 2003 et Klarzinski et Fritig, 2001). Le terme de phytoalexine est plus ancien. Celui-ci fut créé par Müller et Borger en 1940 pour désigner des substances antifongiques apparaissant dans les tubercules de pomme de terre lors d'une contamination par un champignon. Sa définition a été élargie par Paxton en 1981 à « tout composé antimicrobien de faible poids moléculaire synthétisé par la plante et s'y accumulant lors d'une interaction entre cette plante et un microorganisme » (dans Rouxel, 1989).

1. Défenses des plantes face aux stress environnementaux

Les stress environnementaux peuvent être de diverses origines : la plante a par exemple besoin de se protéger face aux rayonnements ultra-violets, aux faibles ou fortes températures, aux blessures et coupures diverses (Dixon et Palva, 1995, cités par Bochu, 2007). Ces stress peuvent conduire la synthèse de phénylpropanoïdes et de phytoalexines par la plante (Dixon et Palva, 1995 ; Grisebach & Ebel, 1978). Autre exemple, dans le cas de la résistance au gel, les mécanismes de défenses font appel au xyloglucane, sucre qui accroît la résistance des cellules en se fixant à leurs parois (Bargain, 2005). Les conditions de nutrition dans le sol : carences en azote, phosphate ou fer, induisent également la synthèse de molécules protectrices ou de molécules facilitant l'absorption en nutriments (Klarzinski *et al.* 2006).

Un autre système de défense qui serait mis en place par la plante lors de stress nutritionnel est celui exposé dans la théorie de l'équilibre croissance/différenciation (GBDH en anglais, soit *growth differentiation balance hypothesis*) présentée par Loomis en 1953. Cette théorie propose que la plante peut gérer ses carences en priorisant ses ressources vers des fonctions clés (dans Herms & Mattson, 1992).

2. Deux types de reconnaissance lors d'une agression

2.1 Reconnaissance gène pour gène

Dans le mécanisme de reconnaissance gène pour gène autrement appelé postulat de Flor (1971), la résistance de la plante dépend de l'interaction entre le produit du gène « d'avirulence »¹ du pathogène et le produit du gène « de résistance » de la plante. Le produit du gène d'avirulence, appelé éliciteur race-spécifique, joue un rôle de ligand, reconnu par un récepteur codé par le gène de résistance de la plante correspondant. Plusieurs gènes d'avirulence ont été caractérisés et étudiés chez les bactéries, champignons et virus (Nürnberger & Brunner, 2002 ; Université du Havre, 2006 [en ligne]).

2.2 Reconnaissance d'éliciteurs généraux

Dans ce cas de figure, la reconnaissance a lieu par l'intermédiaire d'éliciteurs dits « généraux ». Ces éliciteurs, de nature biotique, peuvent être de deux origines :

- éliciteurs exogènes ou PAMP (pathogen associated molecular pattern) : ils proviennent directement de l'agent pathogène. Par exemple : chitine issue de la paroi des champignons pathogènes (Benhamou et Picard, 2000 ; Nürnberger *et al.*, 2002). En remarque, beaucoup d'éliciteurs exogènes ont des fonctions encore mal déterminées au sein des pathogènes (Pajot & Regnault-Roger, 2008) ;
- éliciteurs endogènes : ils correspondent à des molécules issues de la plante elle-même. Ils peuvent être libérés une fois que la cellule a été attaquée notamment lors de la dégradation de la paroi cellulaire (Benhamou et Picard, 2000).

Leur nature chimique est variée : ce sont des oligosaccharides, glycoprotéines, peptides, glycolipides, etc. (Angelova *et al.* 2006). Ces éliciteurs sont considérés comme non-spécifiques / généraux puisque la réponse de défense n'est pas liée à la race ou à l'espèce du pathogène ou de l'hôte (Benhamou et Picard, 2000 ; Nürnberger & Brunner, 2002).

Par ailleurs, l'on peut citer un autre cas de figure qui est le suivant : lors d'attaque fongique, des protéines se trouvant dans les parois cellulaires de la plante entrent en action : ce sont les PIPG, protéines inhibitrices de polygalacturonases. Les polygalacturonases (PG) sont des enzymes fongiques dégradant les composés saccharidiques des parois des plantes et parmi ces PG, se trouvent d'importants facteurs du pouvoir pathogène fongique. L'activité pectolytique des PIPG présente une action de défense directe en lysant ces PG mais aussi indirecte en contribuant à la mise en place de réactions de défense. En effet, les PIPG modulent la coupure des PG afin de produire un maximum de fragments disposant d'un potentiel éliciteur. Donc, grâce aux PIPG, la plante convertit un signal de dégradation pariétale en un signal menant à l'activation de ses gènes de défense (Benhamou & Picard, 2000 ; Howell & Davis, 2005).

3. Les bouleversements chimiques déclenchés suite à une attaque

Nous allons voir dans les parties qui suivent que les plantes, que ce soit à l'issue d'une reconnaissance spécifique ou non, mettent en place un système de défense général dont les mécanismes de bases déclenchés sont toujours les mêmes mais avec des variables selon la nature du stress.

En particulier, lors d'attaques par des micro-organismes, beaucoup affirment que la réponse est indépendante de la nature du pathogène mais les diverses expérimentations menées tendent à montrer que la réponse finale peut différer d'un agresseur à un autre, et qu'elle dépend de la nature de l'éliciteur.

¹ Le produit d'un gène pathogénique provoque des réactions bien différentes selon la sensibilité de la plante : un gène peut déclencher des symptômes chez certaines plantes et dans ce cas, il est nommé « gène de virulence ». Si ce même gène est reconnu par d'autres plantes et qu'il induit la mise en place de moyens de défense, il est dit « gène d'avirulence ».

Au sein des cellules attaquées, de nombreux phénomènes chimiques sont provoqués et interagissent tous ensemble pour construire cette réponse.

3.1 Les premiers évènements déclenchés

Suite à la reconnaissance d'une agression et à l'expression de gènes de défense, une cascade d'évènements de signalisation a lieu (Benhamou et Picard 2000, Zhao *et al.* 2005, Daire *et al.* 2006, Garcia-Brugger *et al.* 2006, Trouvelot *et al.* 2006) :

- La membrane végétale se dépolarise et une fuite d'électrolytes a lieu (K^+ , Cl^-). Les ions chassés permettent l'entrée d'ions H^+ et Ca^{++} et l'acidification cytoplasmique.
- Des protéines G interagissent avec les récepteurs membranaires afin de faciliter les échanges d'ions et d'activer des enzymes clés intervenant dans le métabolisme d'hormones et autres composés.
- De plus, l'acidification cytoplasmique permet d'augmenter par la suite la biosynthèse de métabolites secondaires utiles.
- Les ions Ca^{++} interviennent également dans l'activation (phosphorylation) de protéines kinases ainsi que la production d'oxygène sous forme active, et d'oxyde nitrique. Puis, ils provoquent la dépolarisation de la membrane, stimulant encore plus les influx d'ions calcium dans les cellules. Enfin, ils permettent l'expression de gènes de défense et la production de phyto-alexines (Lecourieux *et al.* 2006).
- Les protéines kinases activées permettent l'amplification et la propagation du signal.
- Les formes actives de l'oxygène (abrégé. ROS pour reactive oxygen species) sont produites en très grand nombre par des NADPH oxydases membranaires. Il s'agit par exemple de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anions superoxyde (O_2^-) et hydroxyl (HO^\cdot). Ces ROS possèdent des propriétés antimicrobiennes et provoquent parfois un burst oxydatif (voir § 4) bloquant la propagation des pathogènes. Elles interviennent dans les réactions menant au renforcement des parois cellulaires, permettent l'accumulation de phytoalexines et de protéines PR (pour Pathogenesis-Related en anglais) (partie § 3.3). Elles participent à la propagation du signal en intervenant dans un système de relais (Van Breusegem *et al.* 2001).
- Du monoxyde d'azote (NO) est également produit et il agit avec les ROS pour produire le burst oxydatif.

3.2 La synthèse de premières hormones signal (Zhao *et al.* 2005)

Les P encadrés indiquent les voies qui sont dépendantes de la phosphorylation/déphosphorylation de protéines. Les Ca^{2+} encadrés indiquent les voies dépendantes des ions calcium

TF : facteurs de transcription ;
PLA : Lipase libérant l'acide linoléique ;
NOS : Oxyde nitrique synthase ;
NR : Nitrate reductase ;
AC et GC : Adénosine monophosphate cyclase et Guanosine monophosphate cyclase.

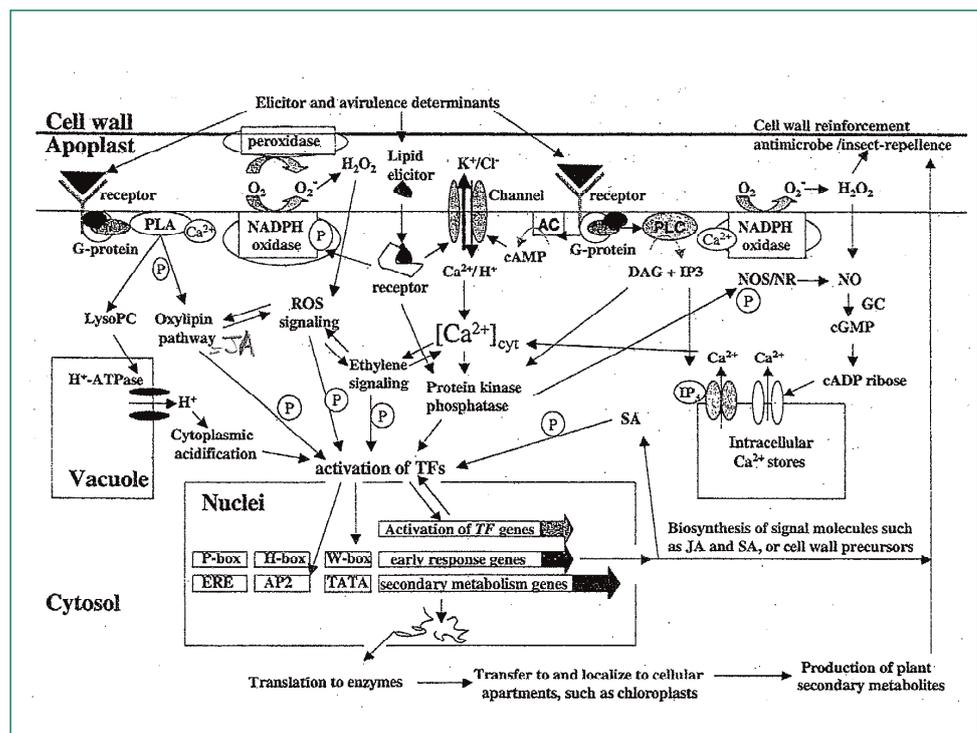


Figure 1 : Réseau de transduction d'un signal d'élicitation • Source : Zhao *et al.* 2005

L'ensemble de ces signaux conduit notamment à l'expression de gènes de défense codant des enzymes impliquées dans la synthèse de phytohormones qui sont l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène et l'acide abscissique (Trouvelot, Dubreuil *et al.* 2006).

Les différents évènements conduisant à cette synthèse sont représentés sur la figure 1 ci-dessus.

7 La voie de l'acide salicylique (SA)

Le rôle principal de l'acide salicylique est de transmettre l'information dans toute la plante afin de mettre en place la résistance systémique acquise (RSA, voir § 4.2). SA induit aussi des réponses de défense comme la production de protéines PR (voir § 3.3) et d'oxyde nitrique (NO). Beaucoup de travaux scientifiques décrivent que SA, en intervenant sur les mécanismes de synthèse de protéines PR « barrières », est un protagoniste dans la lutte contre les attaques de champignons biotrophes (champignons se nourrissant de tissus vivants) (Glazebrook, 2005). Puis, SA intervient parfois dans la réaction hypersensible (voir § 4.1) en modulant l'activité des catalases qui interviennent pour la dismutation de H₂O₂ en O₂ et H₂O (Molinari & Loffredo 2006). Le mécanisme de synthèse de SA n'est pas encore complètement élucidé mais cette molécule est un dérivé de l'acide shikimique (Bourgau, 2008, communication personnelle).

■ Le rôle de l'acide jasmonique (JA)

JA permet la transduction des signaux éliciteurs pour la production de métabolites secondaires dont les phytoalexines (ex. : alcaloïdes, flavonoïdes, terpénoïdes et anthraquinones). JA induit également des gènes codant des protéines PR comme les chitinases, β -1,3-glucanases et inhibiteurs de protéases (Belhadj *et al.* 2006). Enfin, JA est réputé pour déclencher une réponse induite locale (voir § 4.2).

JA fait partie de la famille des oxylipines (lipides) et il est synthétisé à partir de l'acide linoléique dont la dégradation permet également de libérer des composés volatils. JA intervient donc lors d'attaques bactériennes, d'attaques de champignons nécrotrophes (qui tuent leur hôte avant de l'ingérer) (Glazebrook, 2005) mais aussi lors d'agressions d'insectes herbivores et en cas de blessures (Turner *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.* 2005 et Boughton *et al.* 2006).

SA possède un effet antagoniste sur les voies de signalisation de JA. Ce processus se nomme cross-talk (signifiant littéralement : interférences d'une voie sur une autre) et il permet à la plante d'affiner sa réponse de défense (Koornneef *et al.*, 2007).

■ L'intervention de l'éthylène

Cette phytohormone, dont la formation est induite par les ROS, n'amplifie pas la production de métabolites secondaires, mais régule notamment ce processus et induit la stimulation ou l'inhibition de ces éléments en interagissant avec JA (Zhao *et al.* 2005). La libération d'éthylène est aussi due à l'attaque d'organismes phytophages (ex. : insectes piqueurs-suceurs) et dans ce cas, l'éthylène tiendra une fonction d'élicitation de molécules volatiles inhibant par exemple la digestion des insectes (Von Dahl & Baldwin 2007).

■ Le rôle de l'acide abscissique (ABA)

L'acide abscissique est une hormone principalement connue pour son effet sur le déclenchement de la sénescence d'une plante. L'acide abscissique tient en fait un rôle majeur à travers le développement de la plante en intervenant dans la germination, la croissance, la sénescence. Cette hormone intervient également lors de stress abiotiques comme ceux liés au froid, à la sécheresse, à un excès de salinité ou les stress osmotiques (Tapio Palva *et al.*, 2007). L'acide abscissique intervient alors et régule la transcription de gènes de défense. Elle semble provoquer aussi la biosynthèse de métabolites secondaires (Zhao *et al.* 2005). D'autres études ont constaté l'augmentation de la teneur en ABA dans la plante lors d'infections biotiques, mais le rôle qu'il tient s'avère complexe et il semble qu'il interagisse avec SA et JA et provoque un effet favorable ou défavorable pour la protection de la plante selon l'attaque (dans Pajot et Regnault-Roger, 2008).

3.3 La synthèse de composés protégeant et défendant la plante

Toutes les réactions chimiques ainsi que les phytohormones SA, JA et éthylène, en plus de propager l'information dans toute la plante, provoquent la synthèse d'une multitude de molécules de défense facilitée par les bouleversements ioniques. Notamment, les facteurs de transcription de gènes sont activés pour la synthèse d'encore plus de molécules signal ou de diverses molécules de défenses par le métabolisme secondaire (Zhao *et al.* 2005).

Toutes ces molécules ont des fonctions biologiques complémentaires qui contribuent à la protection des tissus et des organes et à l'élimination des pathogènes. Les produits finaux de défense sont distingués au sein de trois grandes catégories :

- **Composés issus du métabolisme secondaire** dont les phytoalexines correspondant à des substances antibiotiques, antifongiques, antivirales ou poisons végétaux.
- **Protéines de défense dites PR** (pour Pathogenesis-Related) définies par Antoniw *et al.* (1980) comme étant des protéines codées par la plante hôte et uniquement induites en situation pathologique.
- **Composés structuraux** : des macromolécules se déposent sur la paroi pectocellulosique pour un renforcement des barrières naturelles. Par exemple, la synthèse de callose ou de lignines est renforcée.

■ Synthèse de métabolites secondaires

Parmi ces métabolites secondaires sont retrouvées les phytoalexines. Ce sont des molécules de faible poids et à fort potentiel antibiotique qui s'accumulent près des sites d'infection. Leur synthèse est donc induite en réponse à un stress biotique, mais elles peuvent également être synthétisées lors de stress abiotique. Leur structure chimique est extrêmement diversifiée et les phytoalexines peuvent être des phénylpropanoïdes, des sesquiterpènes, des terpenoïdes, des polyacétylènes, etc. (Rouxel, 1989 ; Grisebach & Ebel 1978).

D'autres composés de nature volatile peuvent également être synthétisés. Par exemple, la libération de composés volatils par une plante à la suite d'une attaque herbivore sert de moyen de défense direct en ayant un effet répulsif ou intoxicant (Choudhary *et al.* 2008). Ces composés, nommés VOC en anglais pour volatile organic compounds, permettent aussi la propagation d'un signal d'alerte aux autres plantes. Ensuite, ces VOC peuvent attirer des organismes auxiliaires (Heil *et al.*, 2007). Par exemple, deux homoterpènes ont été définis en tant que composés attirant les insectes prédateurs suite à une attaque d'insecte suceur ou à une détection de sécrétions de chenille (Dicke, 1994). Puis, certains VOC ont une activité antimicrobienne (He, Tian *et al.* 2006 & Choudhary *et al.*, 2008). Enfin, Il est apparu que des composés pouvaient également être libérés dans le sol dans le but d'attirer des nématodes entomopathogènes (Turlings *et al.* 2007).

Lors d'un stress abiotique, les molécules synthétisées sont la plupart du temps des phénylpropanoïdes (ex : acides hydroxy-cinnamiques, flavonoïdes, coumarines, psoralènes) souvent classés comme phytoalexines. Dans ces situations, ces molécules permettent de se protéger par exemple contre les rayons UV ou le gel (dans Bochu, 2007).

■ Production de protéines PR pour l'inhibition et la dégradation des pathogènes

Les réactions biochimiques provoquées par l'acide salicylique induisent la synthèse de protéines PR près du site d'infection mais également dans l'ensemble de la plante (Gozzo, 2003). Les protéines PR sont particulièrement abondantes dans les feuilles (Edreva, 2005). 17 familles de protéines PR (notées PR-1 à PR-17) ont été distinguées pour le moment, selon la structure chimique des molécules et leur activité biologique et enzymatique (Van Loon *et al.*, 1999 ; Bressan, 2007). Parmi ces protéines PR, sont retrouvées (Van Loon *et al.* 1999 ; Buhot 2003 ; Edreva 2005) :

- Des chitinases (familles des PR-3, -4, -8 et -11) et β -1,3-glucanases (famille des PR-2) dégradant les composés majeurs des parois des champignons pathogènes. Ces enzymes permettent en retour la libération de fragments de chitines et de β -1,3-glucanes à activité élicitrice.
- Les protéines PR-5 regroupent des osmotines et des protéines de type thaumatine qui provoquent la perméabilisation des membranes fongiques et bactériennes et qui induisent l'apoptose (Bressan, 2007).
- Des inhibiteurs des protéinases (PR-6 et PR-7), impliqués dans la défense contre les insectes et les nématodes notamment.

- Les PR-8 possèdent une activité lysozyme, c'est-à-dire qu'elles sont capables de lyser des bactéries.
- Des peroxydases (protéines PR-9), qui participent au renforcement des parois cellulaires en catalysant le dépôt de lignine.
- La famille des PR-10 regroupe les ribonucléases qui seraient actives contre les virus et aussi contre les champignons.
- Les protéines PR-12, PR-13 et PR-14, comme les protéines PR-5, montrent une activité antifongique et antibactérienne en agissant sur la perméabilité des membranes plasmiques. Les protéines PR-12 sont également nommées défensines (abrégées pdf en anglais pour plant defensins, Sels et al. 2007)
- Des protéines PR-15 et PR-16 de type germine qui est une enzyme capable de produire des formes actives de l'oxygène chez l'orge et le blé.
- Seules les protéines PR-1 ont une fonction mal définie mais elles sont particulièrement actives sur les champignons.

L'induction des protéines PR a pu être observée chez de nombreuses espèces végétales appartenant à différentes familles. Par contre, toutes les familles de protéines PR n'ont pas forcément été retrouvées au sein de chaque espèce de plante examinée (Van Loon & Van Strien, 1999).

■ Renforcement des barrières physiques

Pour ce qui est de la réponse morphologique, les réactions de défense déclenchent plusieurs mécanismes qui ont pour but de solidifier l'architecture pariétale et ainsi de ralentir la pénétration de l'agent pathogène et la diffusion de toxines et enzymes microbiennes dans les tissus (Benhamou et Picard, 2000).

D'abord, un dépôt de callose a lieu sur la paroi végétale suite à l'activation de la β -1,3-glucane-synthase par le Ca^{2+} . Ensuite, la lignine et la subérine s'incrustent, des composés phénoliques pré-existants s'y infiltrent et enfin des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) s'accumulent dans les parois (voir figure 2). Ce renforcement résulte en partie de l'activité des peroxydases lors du burst oxydatif (dans Pajot & Regnault-Roger, 2008).

Cette première réaction permet à la plante d'avoir le temps d'activer les autres voies de synthèse menant à la production de molécules de défense à action directe.

■ En résumé

Pour conclure les phytoalexines, les protéines PR et les mécanismes de solidification de la paroi constituent ensemble une réponse élaborée de la part de la plante pour se défendre face à un agent pathogène.

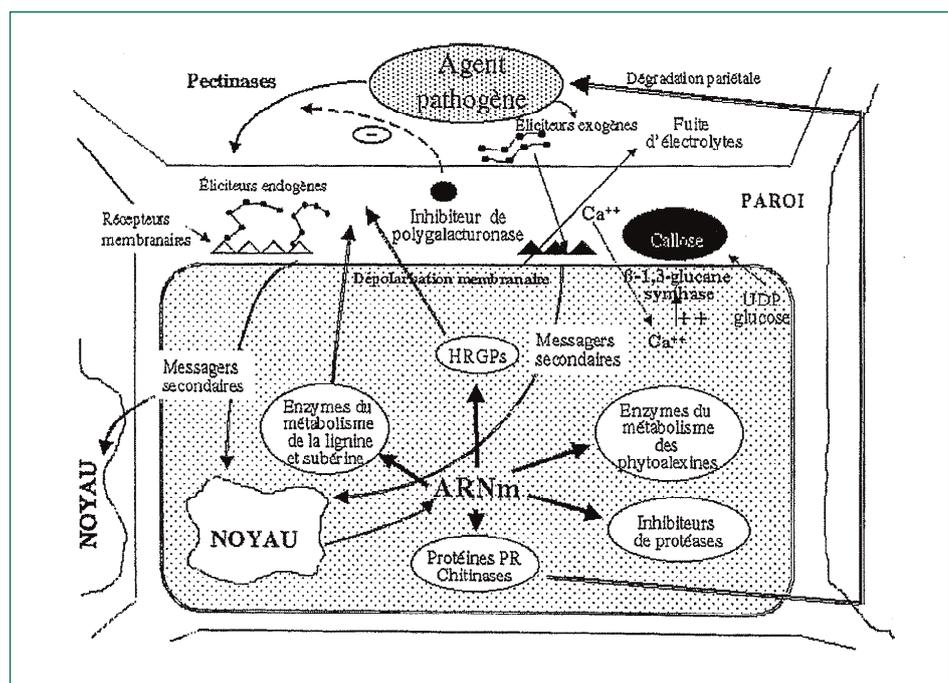


Figure 2 : Schéma simplifié des principales réactions de défense structurales et biochimiques élaborées par la plante en réponse à l'agression • Source : Benhamou et Picard, 2000

4. Une réponse locale plus ou moins sévère et l'acquisition d'une protection systémique

4.1 Réaction hypersensible, réponse rapide

Dans certaines conditions, la plante met en place une réaction hypersensible correspondant à l'auto-destruction de la cellule attaquée voire des cellules voisines. Cette réponse précoce permet notamment de confiner le pathogène à son site d'infection et de limiter son accès à l'eau et aux nutriments (Buhot, 2003 ; Glazebrook, 2005). Il semble que ce phénomène soit souvent le résultat de la reconnaissance d'un éliciteur spécifique plutôt que général (Greenberg & Yao, 2004). Et, globalement, la réaction est efficace contre les attaques de pathogènes à tendance biotrophe mais pas contre les organismes à tendance nécrotrophe (Glazebrook, 2005).

Les mécanismes moléculaires déclenchant la réponse hypersensible sont encore flous, mais il est admis que le burst oxydatif est l'un des mécanismes, ou le mécanisme initial, participant à la mort de la cellule attaquée par le pathogène (Delledone *et al.* 2001, cité par Trouvelot *et al.* 2006 ; Martinez et Loison 2006).

4.2 Résistances locale et systémique acquises

Une résistance s'établit localement grâce à la diffusion des hormones et de divers signaux : une résistance locale acquise est enclenchée. Elle est caractérisée par la mise en place de tissus autour des lésions qui seront insensibles à une attaque future (Pajot & Regnault-Roger, 2008). Le JA y jouant, semble-t-il un rôle majeur.

Puis, souvent, le phénomène de résistance est propagé à l'ensemble de la plante de manière systémique et permet ainsi de préparer les cellules non touchées à une attaque : ce phénomène est nommé résistance systémique acquise (RSA). La RSA permet de protéger la plante contre un large éventail d'agresseurs. Il est fort probable que les molécules impliquées dans la mise en place de la RSA sont le peroxyde d'hydrogène et l'acide salicylique (Van Breusegem *et al.* 2001). L'éthylène, l'acide jasmonique et les protéines PR participent également à la propagation de l'information comme elles sont systémiques mais le rôle de chacune de ces molécules n'est pas encore clairement défini (Klarzynski et Fritig, 2001 ; Buhot, 2003).

Enfin, outre la RSA, il a été distingué par des chercheurs d'autres types de réponses systémiques :

- **La Résistance Systémique Induite (RSI)**, qui est, elle, indépendante de SA mais qui est régulée comme la RSA par les médiateurs acide jasmonique et éthylène (Pajot & Regnault-Roger, 2008). De plus, elle n'entraîne pas systématiquement la synthèse de protéines PR (Van Loon & Van Strien, 1999). La RSI a particulièrement lieu lors d'une colonisation par des rhizobactéries (Hammond-Kosack & Parker, 2003). Ensuite, la mise en place de l'une ou l'autre des résistances, ou des deux à la fois, est fonction du mode trophique du pathogène : un pathogène biotrophe déclenche la RSA tandis qu'un pathogène nécrotrophe est à l'origine de la RSI (Glazebrook, 2005).
- **La Résistance indépendante de la RSA**. Dans ce cas, les protéines PR ne sont pas synthétisées. Les mécanismes induisant cet autre type de résistance restent à être déterminés (Hammond-Kosack & Parker, 2003).

De par l'acquisition de cette résistance systémique, la plante est prête à riposter en cas d'attaque. Un délai de quelques heures à quelques jours (en général 24 à 48 heures) est nécessaire pour sa mise en place. Une fois établie, cette résistance peut durer jusqu'à plusieurs semaines (Gozzo, 2003).

5. Un nouveau mode de lutte basés sur ces mécanismes

Le phénomène constaté de résistance systémique acquise a ouvert une nouvelle piste de travail sur les stratégies de protection des plantes : celle de l'utilisation d'éliciteurs. La notion de stimulateurs de défenses naturelles (SDN) des plantes est alors apparue.

Un SDN se définit ainsi : substance qui, après application sur une plante, lui permet d'enclencher ses mécanismes de défense et ainsi d'être en état de résistance vis-à-vis d'une agression à laquelle elle serait normalement sensible, ou face à des conditions stressantes (sécheresse, gel, carences).

Ce sont des molécules de faible poids moléculaire d'origine animale, végétale, minérale ou des molécules de synthèse, généralement non toxiques pour les micro-organismes, qui endossent le rôle de SDN (Pajot, Aveline *et al.* 2005).

Ces molécules pourraient être utilisées pour la protection des plantes à titre préventif et permettraient éventuellement de réduire les applications de produits phytopharmaceutiques contre les insectes, les maladies fongiques et les bactéries. En effet, de nombreuses recherches au niveau cellulaire ont prouvé l'existence et l'efficacité du système de défense induit contre les ravageurs et pathogènes, et les premières expérimentations appliquées ont donné des résultats qui semblent prometteurs dans les filières de la viticulture, des grandes cultures et des cultures légumières. Mais il faut retenir que la diversité des molécules pouvant être élicitrices est considérable et que ce domaine de travail représente un large champ d'investigation pour les chercheurs (Regnault-Roger, 2005).

Les différentes molécules d'origine naturelle ou de synthèse ainsi que leurs caractéristiques vont être présentées dans le chapitre « L'application de (SDN) stimulateurs de défenses naturelles ».

6. La synthèse de composés du métabolisme secondaire

Toutes les recherches effectuées sur les mécanismes de défense des plantes ont également mis à jour la piste de travail portant sur l'utilisation des éliciteurs pour accroître la synthèse de métabolites secondaires ayant une importance industrielle (ex : substances utilisées pour leur propriétés pharmaceutiques ou alimentaires) (Radman *et al.* 2003). Dans le chapitre « Production de métabolites secondaires par élicitation », les différents moyens d'élicitation et les résultats obtenus seront résumés pour chacun des différents métabolites secondaires à l'étude.

L'application de SDN - stimulateurs de défenses naturelles

1. Deux types de molécules et deux types d'élicitation

1.1 De la simulation d'une attaque à la stimulation des voies de signalisation

D'abord, certains SDN agissent en venant se fixer sur les récepteurs membranaires de la plante qui détectent l'agression et transmettent les signaux nécessaires à la mise en place d'un arsenal de défense. Les SDN de cette catégorie qui sont principalement étudiés sont soit :

- des composés protéiniques, saccharidiques, etc., issus de pathogènes, qui représentent des motifs propres à un microbe et qui viennent se lier à des récepteurs reconnaissant ces motifs. Ces composés sont nommés PAMP en anglais pour Pathogen-associated molecular patterns (Nürnberg & Brunner, 2002) ;
- des composés extraits d'animaux, végétaux ou algues mimant les PAMP ;
- des versions avirulentes de pathogènes, encore que ce procédé se rapproche de la lutte biologique.

D'autre part, les SDN peuvent être des molécules intervenant dans la cascade des signaux : ces molécules, au lieu de mimer l'agression d'un pathogène, s'insèrent directement dans la cascade complexe des signaux de la plante qui la conduisent à mobiliser ses moyens de défense (Blanchard et Limache, 2005). En général, ces SDN sont des molécules analogues de l'acide salicylique ou de l'acide jasmonique.

1.2 Elicitation directe ou potentialisation de la plante

Une première catégorie de SDN provoque, dès son application, une cascade de réactions de défense destinées à protéger la plante d'une agression de la part d'un agent pathogène, qu'il soit présent ou non. Ce phénomène est nommé élicitation directe (Trouvelot, Dubreuil *et al.* 2006).

Les autres SDN ne déclenchent pas la production de molécules de défense dès leur application et à l'heure actuelle, les chercheurs n'ont pas encore détecté de changement chimique spécifique lors de leur application. Ils ont simplement constaté que le processus de défense n'est réellement mis en route qu'en cas d'infection et ceci de façon rapide et intense. C'est le phénomène de potentialisation de la plante et les SDN de cette famille sont nommés potentialisateurs.

L'intérêt de ce mécanisme est que la plante, tant que la pression parasitaire est faible, conserve toutes ses ressources pour sa croissance et sa reproduction. En effet, certains scientifiques déplorent que l'application de SDN induise la mise en production de métabolites secondaires et utilise par conséquent du carbone au détriment de la croissance (Fardeau et Jonis, 2004).

Des substances tel l'acide salicylique, les polysaccharides bactériens ou l'acide β -aminobutyrique (BABA) peuvent provoquer ce phénomène mais les mécanismes à l'origine de ce processus ne sont pas encore expliqués.

D'autre part, la potentialisation tient également un rôle dans l'amélioration de la tolérance à des stress abiotiques (Jakab *et al.* 2005).

Cependant, le fait qu'aucun effet ne puisse être mesuré lors de l'application d'un potentialisateur rend le travail d'identification des SDN potentialisateurs très délicat. Un des enjeux de la recherche actuelle est donc de pouvoir identifier un marqueur fiable de l'état de potentialisation avant de décrypter les mécanismes et les bases génétiques de ce phénomène.

Enfin, il faut préciser que tous les éliciteurs présentés dans les parties qui suivent sont des éliciteurs généraux et non des éliciteurs race-spécifiques, ces derniers correspondant à l'expression de gènes pathogènes. Ce domaine d'étude relève donc du génie génétique.

2. Molécules d'origine animale et fongique

2.1 Le chitosan, polysaccharide dérivé de la chitine

■ Présentation et extraction de la substance active

Le chitosan, ou chitosane, est un polymère de n glucosamines (son nom chimique est β -1,4-poly-D-glucosamide) retrouvé en faible proportion dans la paroi de la plupart des champignons pathogènes et en grande quantité dans la carapace des crustacés et insectes. Ce polysaccharide a des propriétés particulières car des charges positives sont dispersées sur la molécule (propriétés polycationiques). Cette matière active est obtenue par déacétylation de la chitine (AFPP, en ligne).

■ Mode d'action

Le chitosan peut inhiber le développement de différents champignons (il provoque des altérations structurales et une désorganisation moléculaire) et possède de plus un puissant pouvoir éliciteur des défenses naturelles chez les plantes, sans pour autant être phytotoxique.

Des travaux menés dans les années 1990 ont mis à jour ses propriétés élicitrices mais ont déterminé aussi que des degrés de polymérisation et de déacétylation variables provoquaient une réponse variable (Benhamou et Picard, 2000) ce qui rend le travail de définition d'un bon SDN encore plus délicat.

■ Cadre réglementaire

En Europe, le chitosan, qui a longtemps fait partie des substances autorisées à des fins phytopharmaceutiques dans la directive 91/414/CEE, a été retiré de la liste suite à la décision de la commission européenne n° 2007/442/CE du 21 juin 2007 (consultable en ligne). Seule la Pologne bénéficie d'une dérogation pour l'utilisation du chitosan sur légumes et plantes ornementales jusque fin juin 2010.

En 2008, des spécialités commerciales à base de chitosan sont homologuées aux USA contre les maladies fongiques de la vigne (AFPP, en ligne). Cependant, les conditions d'homologation de produits phytosanitaires dans ce pays ne prennent pas en compte leur efficacité réelle.

■ Les travaux menés sur le chitosan

Lutte contre la fusariose de la tomate (Benhamou et Picard, 2000)

Ces travaux ont débuté en 1992, et ont porté sur la pourriture des racines et du collet de la tomate (*Solanum lycopersicum*) causée par *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *radicis-lycopersici* ou FORL.

D'abord, des essais ont eu lieu en chambre de croissance sur des plantules âgées de trois à quatre semaines sur lesquelles a été appliqué du chitosan par enrobage des racines ou vaporisation sur le feuillage. Les observations ont été nombreuses :

- Réduction significative des lésions racinaires causées par le FORL.
- Préservation de l'intégration tissulaire des racines en comparaison au témoin.
- Meilleur développement racinaire.
- Restriction de la colonisation parasitaire.
- Altération des cellules fongiques.
- Élaboration de multiples réactions de défense : accumulation d'un matériel enrichi en composés phénoliques le long des parois des cellules de l'épiderme et du cortex racinaire, imprégnation des parois par la lignine, épaissements pariétaux (formation de papilles) et occlusion des espaces intercellulaires par de la callose.

Ensuite, au vu de ces résultats très prometteurs, des applications de chitosan ont été effectuées sur des cultures de tomates en serre (conditions réelles de production) à des doses de 12,5 à 37,5 mg/l de substrat. La dose de 37,5 mg/l a permis de réduire de plus de 90 % la mortalité attribuable au FORL par rapport au témoin non traité inoculé, et d'obtenir un rendement équivalent à une culture non inoculée par le FORL.

Protection du tabac contre *Phytophthora parasitica* (Falcon-Rodriguez et al. 2007)

Les expérimentations se sont déroulées sur des plants de tabac cubain sensibles au champignon, plantées en substrat stérilisé et cultivées sous conditions de température et de lumière contrôlées.

L'application de chitosan a eu lieu de deux manières :

- trempage des graines en solution à 0,1, 0,5 ou 1 g/l pendant 4 heures
- ou, pulvérisation sur des plantes de 30 jours avec chacune des trois solutions

Les inoculations du *Phytophthora parasitica nicotianae* ont eu lieu sur des plantes de 35 jours en milieu artificiel infecté et les mesures ont été effectuées sur des plantes de 40 jours.

Les taux d'infection des plantes traitées ne sont pas significativement inférieurs même s'il a été constaté que les graines traitées ont enregistré entre 6 et 10 % de pertes en moins que le témoin, et les plantes pulvérisées, presque 20 % en moins. De plus, une pulvérisation a permis aux plantes d'être moins sévèrement touchées par la maladie et de limiter nettement le nombre de plantes mortes.

Les mesures des activités glucanases, chitinases et chitosanases ont montré que la plus faible concentration (0,1 g/l) était la plus efficace. Les activités des enzymes des plantes pulvérisées sont significativement supérieures au témoin tandis que seule l'activité des chitinases a augmenté chez les plantes issues de graines immergées. L'activité PAL a montré que les plantes pulvérisées ont été plus élicitées que les plantes issues de graines immergées. La PAL (phénylalanine-ammonia-lyase), est une enzyme clé dans les voies de synthèse de composés phénoliques. Enfin, la teneur en H₂O₂ a également augmentée au sein des plantes élicitées.

En conclusion, l'application de chitosan n'a amené qu'une protection partielle mais non négligeable pour le cas des plantes pulvérisées donc cette piste doit encore être étudiée. Par ailleurs, les expérimentateurs ont émis l'hypothèse que le chitosan utilisé n'était peut être pas assez déacétylé (il l'était à un taux de 12 %) pour l'obtention d'une élicitation efficace. Par contre, ce degré de déacétylation fournit un chitosan aux propriétés inhibitrices importantes sur les pathogènes.

Le chitosan contre *Botrytis cinerea* (Trotel-Aziz et al. 2006 ; Amboraré et al. 2004)

Le chitosan a été évalué sur le développement de la pourriture grise sur la vigne par une équipe de chercheurs champenois en laboratoire et au champ.

Dans un premier temps, l'effet direct du chitosan sur le développement du champignon a été vérifié in vitro : le chitosan bloque le développement mycélien. De plus, des feuilles de vignes élicitées ont montré une augmentation rapide de l'activité des enzymes PAL, LOX et chitinases. LOX (lipoxygénase) permet la synthèse de précurseurs de l'acide jasmonique.

Dans un deuxième temps, des essais ont été menés en conditions réelles sur deux parcelles de Chardonnay.

D'abord, une pulvérisation de « ChitN15 » à une concentration de 300 mg de chitosan/l de bouillie a été effectuée une première fois et a permis le suivi de l'expression des mécanismes de défense de la vigne :

- Il a été montré que l'activité de la PAL était bien stimulée. Le maximum d'activité est observé au 14^{ème} jour après l'application. Un deuxième traitement effectué 15 jours après n'a pas augmenté l'activité de la PAL.
- De plus, l'activité des chitinases a été fortement stimulée 14 jours après le premier traitement et elle a été maintenue pendant plusieurs semaines (au moins un mois). En fait, il a été remarqué que la stimulation des chitinases apparaissait juste après que celle de la PAL soit affaiblie.
- Enfin l'activation de β -1,3-glucanases a été évaluée ; celle-ci augmente fortement 7 jours après application et est maintenue pendant plusieurs jours.

Ensuite, la contamination par le botrytis a été évaluée en termes d'intensité et de fréquence sur deux années consécutives :

- Sur la première parcelle, une protection a été obtenue avec une application de ChitN15 2 % en deux fois : en préventif et en curatif 1 mois plus tard. L'efficacité contre *B. cinerea* a été de 40 %. Des doses moins élevées et l'application d'un seul traitement ne sont pas apparues efficaces.
- Sur la deuxième parcelle, avec une intensité et une fréquence d'attaque un peu plus faibles, ChitN15 à 2 % appliqué en deux fois a fourni une efficacité de 60 %, tandis que l'application de produits chimiques n'a été efficace qu'à 46 %. Mais ces très bons résultats n'ont pas été validés en 2^{ème} année où l'application de 4 traitements de concentration 2 % n'a apporté qu'une efficacité de 37 % contre 69 % avec les produits chimiques.

Ces résultats permettent de formuler les conclusions suivantes :

- Deux applications sont plus efficaces qu'une, mais quatre applications ne semblent pas améliorer la protection. Ce constat n'est pas un résultat reproductible comme il est difficile de comparer des efficacités sur deux années différentes mais il a ouvert une piste de travail.
- Il existe bien une corrélation entre réponses de défense induite et pourcentage de protection de la vigne contre *B. cinerea*.
- L'effet du chitosan sur la fréquence et l'intensité des attaques varie fortement d'une parcelle à une autre avec des modalités de traitement identiques. Il doit exister des interactions génotype / facteurs abiotiques / pratiques culturales qui influent sur le fonctionnement de la plante et l'expression de ses défenses naturelles.
- Il semble enfin que le chitosan soit plus efficace sous une pression parasitaire plus faible.

Opportunité d'utilisation pour les plantes ornementales françaises

Le chitosan a été étudié par les expérimentateurs du réseau Astredhor en partenariat avec le laboratoire BBV (Bretagne Biotechnologie Végétale) et l'INRA de Grignon (STEPP 2005, 2006 et 2007).

En 2005, des essais en laboratoire correspondant à des inoculations par une suspension fongique sur des plantes élevées en phytotron n'ont pas détecté d'effet réellement intéressant de la part du chitosan pour une protection du cyclamen contre la fusariose causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* et ce, à une concentration de 2% v/v² soit 20 ml/l (dose recommandée par le fabricant).

Des essais ont également été effectués lors de l'étude des couples chrysanthème / rouille brune (*Puccinia chrysanthemii*) et chrysanthème / rouille blanche (*Puccinia horiana*). Une fois de plus, la protection ne s'est pas révélée être suffisante. Pourtant, à leur connaissance une équipe polonaise a évalué un effet non négligeable du chitosan contre *P. horiana* en 1999 et 2002.

Malgré tout, des essais ont été menés en conditions de production réelles sur chrysanthèmes : 3 applications ont été effectuées à 12 jours d'intervalle puis des plantes inocultrices ont été introduites pendant 13 jours. Le chitosan n'a pas fourni une protection adéquate, tout comme les produits chimiques, il faut le préciser.

2.2 L'acide cholique (Koga, Kubota *et al.* 2006)

■ Présentation et extraction de la substance active

Une équipe de recherche japonaise a détecté des effets de l'acide cholique sur les défenses naturelles du riz (*Oryza sativa*). L'acide cholique est un acide biliaire et il est retrouvé dans les fèces des animaux, il se trouve donc parfois dans les composts fermentés utilisés en tant que fertilisants.

■ Mode d'action, exemple sur le riz

Lors de l'étude, le traitement des feuilles de riz à l'acide cholique a induit une réaction hypersensible ainsi que la synthèse de protéines PR et l'accumulation de phytoalexines. Il a été également vérifié que l'acide cholique n'agissait pas directement sur les agents pathogènes. Les chercheurs ont ensuite établi qu'une dose d'acide cholique de 20 micromoles (μM) appliquée sur les feuilles ou au niveau des racines, permettait une réponse suffisante pour que le riz soit significativement résistant à un pathogène (test effectué avec le champignon pathogène *Magnaporthe grisea*). De plus, la réponse de défense a été très rapidement déclenchée et a induit principalement la synthèse de phytocassanes. Etant donné que les mécanismes de défense du riz induisent habituellement la production de deux phytoalexines (phytocassanes et momilactones), il semble que la réponse induite par l'acide cholique ne se traduit que par la stimulation de quelques voies métaboliques.

Par ailleurs, les chercheurs ont testé d'autres acides biliaires afin de juger de leur efficacité et aucun n'a été aussi efficace que l'acide cholique prouvant les particularités de cette molécule et sa reconnaissance par le riz (forte importance de la position des groupes hydroxyles en C7 et C12 et carboxyle en C24). Ces constats montrent que les plantes de riz reconnaissent l'acide cholique grâce à des récepteurs membranaires bien particuliers.

² La notation % v/v correspond au pourcentage que représente le volume du produit dans le volume total de la solution.

Pourtant, si cette molécule s'avérait être un SDN efficace sur d'autres plantes, elle pourrait représenter une alternative idéale, cette substance pouvant être produite à bas coût et ayant une action à très faible dose.

2.3 Utilisation de formes avirulentes de champignons pathogènes

Leptosphaeria maculans et *L. biglobosa* sont deux espèces de champignon : la première est responsable de la maladie du chancre sur colza (*Brassica napus* L.) et la deuxième représente une forme moins virulente de *Leptosphaeria*. L'idée a été de soumettre des plantes de colza à la « pression » de *L. biglobosa* avant de les inoculer avec la forme virulente. Un cycle de production de colza s'étale de décembre à juin et les plantes sont habituellement soumises à la pression du champignon pathogène tout au long de leur culture.

Sur les trois années d'essais au champ, il s'est avéré que la pré-inoculation en automne avec *L. biglobosa* a permis de diminuer significativement les lésions causées sur les feuilles par l'espèce *L. maculans* 1 mois après mais ceci n'a été vérifié que pendant 2 années.

Juste avant la récolte du colza, la protection des tiges grâce à *L. biglobosa* n'a été constatée que lors de la 1^{ère} année de tests.

Ce traitement ne permet donc pas de protéger la culture jusqu'au moment de la récolte, mais peut être qu'il pourrait faire partie de la stratégie de lutte globale contre le chancre du colza. Suite à ces résultats, l'équipe s'est donc concentrée sur la définition d'une période de pré-inoculation qui éliciterait une réponse optimale contre le chancre des tiges avant la récolte (Liu *et al.* 2007).

En remarque, *L. biglobosa* ne peut pas vraiment être considéré comme un SDN car la définition de ce terme indique que ce doit être une molécule de faible poids moléculaire (voir § 5 de la partie précédente). *L. biglobosa* pourrait être plus justement considéré comme un outil de lutte biologique. Cependant, ce champignon peu virulent semble participer à la mise en place de défenses naturelles chez les plantes, c'est pourquoi cette piste de travail est abordée dans ce rapport.

Puis, d'autres chercheurs ont étudié l'effet d'une pulvérisation d'éliciteurs excrétés par *L. maculans* sur le colza. Il s'est avéré que cette préparation empêchait le développement de la maladie mais qu'en contrepartie, de fortes concentrations retardaient la croissance des plantes. Ce résultat indique que ce champignon excrète des composés éliciteurs ainsi que des composés phytotoxiques (Sasek *et al.*, 2007).

2.4 Application d'un extrait saccharidique d'*Aspergillus niger* (Hindumathy *et al.* 2006)

Afin de protéger des pousses de *Penisetum glaucum* (millet) sensibles à *Sclerospora graminicola*, agent du mildiou, une équipe indienne a trempé des graines dans diverses suspensions d'extrait saccharidique d'*Aspergillus niger*.

Les graines ont été trempées pendant 3 à 12 heures dans des suspensions allant de 0,25 à 2 mg d'extrait saccharidique/ml. Puis, elles ont été transférées en pots et maintenues sous serre. Elles ont été inoculées par *S. graminicola* 2 jours après la plantation.

Les résultats ont montré que les graines traitées pendant un temps inférieur ou égal à 6 h, ont présenté un meilleur taux de germination et les plantes obtenues étaient plus vigoureuses que les plantes témoin.

Ensuite, un traitement de 6 heures à 0,5 mg/ml a fourni, après 30 jours de culture, une protection de 67 % contre le mildiou (soit 67 % de plantes touchées en moins par rapport au témoin), atteinte 3 jours après l'élicitation.

Il a été observé que les phénomènes biochimiques et physiologiques ayant permis cette protection sont l'augmentation de l'activité des peroxydases (protéines PR), la formation de lignine et le dépôt de callose sur les parois des cellules.

2.5 Protéines issues du genre *Phytophthora*

Peptides Pep13 (Brunner *et al.* 2002)

Ces peptides sont des fragments de glycoprotéines issues du genre *Phytophthora*.

Testés sur persil et pomme de terre, les Pep13 induisent la synthèse d'éthylène et de phytoalexines ainsi que l'expression de certains gènes codant pour des protéines PR.

Par exemple, pour lutter contre le mildiou de la pomme de terre causé par *Phytophthora infestans*, un apport de Pep13 à une dose de 10 nM est suffisant pour induire l'accumulation de transcrits de gènes de défense.

Sur le persil, plante non-hôte de *Phytophthora* (c'est-à-dire résistante à tous les isolats de l'espèce), Pep13 déclenche également une réaction de défense.

Par contre, sur pomme de terre, la moindre mutation au sein de Pep13 empêche le déclenchement d'une réponse.

Donc, ces résultats amènent à dire que Pep13, éliciteur général se fixe sur des récepteurs à haute affinité issus de plantes hôtes (comme la pomme de terre) mais aussi de plantes non-hôtes (comme le persil).

NPP1, necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1

La protéine NPP1 a été purifiée à partir de *Phytophthora parasitica* mais appartient à une famille de protéines souvent retrouvées chez les microorganismes.

Le nom NPP1 est dû au fait que cette protéine, en plus d'induire comme Pep13, les réponses précoces habituelles (production de ROS, augmentation de la teneur en Ca²⁺ dans la cellule, etc.), provoque une réponse hypersensible (constatée sur persil, tabac, soja ou *Arabidopsis* sp. mais pas sur monocotylédones) (Fellbrich *et al.* 2002). De plus, il a été vérifié que cette protéine se fixe sur un récepteur différent de celui de Pep13 mais que la réponse induite dans les cellules fait appel aux mêmes voies de signalisation.

D'autres protéines proches de NPP1 ont été retrouvées au sein d'autres champignons et bactéries. A citer la protéine NEP1 issue de *Fusarium oxysporum* ou encore PaNie issue de *Pythium aphanidermatum*.

3. L'utilisation de bactéries et composés bactériens

3.1 Application de protéines bactériennes : les harpines

■ Présentation et extraction de la substance active

Les harpines sont de petites protéines acides, thermostables et riches en glycine, produites par des bactéries phytopathogènes comme *Erwinia amylovora* ou *Pseudomonas syringae*. Ces protéines sont libérées par un système de sécrétion au contact de la membrane plasmique végétale (Buhot, 2003).

■ Mode d'action

L'harpine permet la mise en place de mécanismes de la réaction hypersensible et de la résistance systémique acquise en activant à la fois les voies de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique et en induisant la production de protéines PR 1 et 2 (β -1,3-glucanase) (Buhot, 2003 ; AFPP [en ligne]). Elle n'a aucun effet direct sur les maladies fongiques (Yang *et al.* 2007), son action est donc uniquement élicitrice.

■ Cadre réglementaire et toxicologique

Un produit homologué aux Etats-Unis, nommé Messenger[®], contient cette substance active à 3 %.

Son autorisation concerne les agrumes, la vigne, l'arboriculture fruitière, la production de tomates, de blé et d'orge à des doses comprises entre 5 et 30 g/ha de matière active. Les applications peuvent être renouvelées plusieurs fois. Messenger est également homologué en Espagne.

L'AFPP souligne que son efficacité est partielle et pas toujours reproductible dans le cas du feu bactérien.

■ Exemples de travaux réalisés sur cette molécule

Une protection variable contre les maladies fongiques

Messenger a été testé en 2004 par Bishnoi *et al.* aux Etats-Unis. Il s'agissait d'évaluer l'effet de ce produit sur la maîtrise d'*Alternaria solani* sur tomate et de *Leptosphaeria maculans* sur cultures de canola (colza de printemps) à différentes concentrations.

Un split-plot sur trois variétés de tomate avec trois répétitions et deux doses a été mis en place. Un autre split-plot a été mis en place pour le canola.

Sur tomate comme sur canola, les doses testées de Messenger (soit 5 g/ha et 10 g/ha de matière active) n'ont pas fourni de réelle protection contre les pathogènes étudiés ; une baisse des symptômes a été constatée mais pas de manière statistiquement significative.

En France, l'harpine a été testée contre la fusariose du cyclamen et la rouille du chrysanthème en conditions réelles. L'inoculation a eu lieu 7 jours après la première application à une concentration de 0,5 g/l, puis d'autres applications ont eu lieu tous les 15 jours. L'harpine n'a montré aucune efficacité en conditions contrôlées contre la fusariose. Par contre, elle a fourni de très bons résultats sur les premiers jours contre la rouille brune mais l'effet protection a rapidement chuté pour faire place à la maladie au bout d'une vingtaine de jours (STEPP, 2005).

Les tests ont été réitérés en 2006 en laboratoire. Contre la rouille blanche du chrysanthème, l'efficacité mesurée par rapport au témoin a été nulle. Par contre, avec le même protocole expérimental, les résultats ont été très bons contre la rouille brune du chrysanthème. Aucun résultat n'a cependant pu être obtenu en conditions réelles, l'effet de l'harpine n'est donc pas encore validé sur la rouille brune (STEPP 2006).

Pas de protection efficace contre les insectes suceurs-piqueurs (Boughton *et al.* 2006)

Il s'agissait de savoir si une application d'harpine (Messenger®) pouvait protéger des plants de tomate cultivés en serre sur substrat artificiel contre le puceron vert *Myzus persicae*.

Les tests ont eu lieu aux Etats-Unis, les doses testées correspondaient à la préconisation du fournisseur, à deux fois la préconisation et à 1/2 fois la préconisation (soit des doses de 0,003 % p/v à 0,012 % p/v³). Les applications ont eu lieu par pulvérisation jusqu'à saturation des feuilles.

Aucune augmentation de l'activité enzymatique des peroxydases et des polyphénols oxydases qui sont synthétisées par des voies dépendantes de l'acide jasmonique n'a été enregistrée. Puis, il n'a pas été constaté de différence sur la croissance de la population de pucerons par rapport au témoin. L'harpine ne déclenche donc pas les mécanismes permettant de protéger les plantes contre les attaques de ravageurs piqueurs, l'acide jasmonique tenant un rôle important dans l'induction de ces mécanismes.

Application d'harpine en post-récolte (Yang *et al.* 2007)

Enfin, l'harpine a été testée sur melons chinois récoltés (*Cucumis melo*) pour voir si ce produit pouvait les empêcher de pourrir lors de leur conservation post-récolte face à *Alternaria alternata*, *Fusarium semitectum* et *Trichothecium roseum*.

Les essais ont eu lieu sur des fruits traités à l'harpine aux doses de 30, 60, 90, 120 et 200 mg/l. 2 jours après le traitement, des inoculations avec chacun des trois pathogènes a eu lieu et les fruits ont ensuite été conservés à 22 °C.

Les résultats ont montré que, malgré la présence constante de mycélium sur les témoins et sur les melons traités, les melons traités ont présenté moins de lésions ; la dose optimale étant de 90 mg/l pour obtenir des lésions de diamètre 20 % inférieur au témoin, 9 à 14 jours après inoculation. Ces caractéristiques sont bien le signe d'une protection suite à une stimulation des défenses des fruits. Les mesures des teneurs en enzymes de défenses glucanases, chitinases et peroxydases ont appuyé cette conclusion.

Par ailleurs, il a été calculé que le temps entre le traitement à l'harpine et l'infection fongique avait une forte influence sur l'efficacité du traitement, le mieux étant une période de latence de 2-3 jours. Des temps inférieurs ou supérieurs diminuent l'efficacité.

En matière de conservation post-récolte, l'harpine a été testée avec succès sur pommes à une dose de 80 mg/l pour la lutte contre *Penicillium expansum* (de Capdeville *et al.*, 2002 et 2003) ainsi que sur poires à une dose de 90 mg/l (dans Yang *et al.* 2007).

³ La notation % p/v (poids/volume) représente le nombre de grammes d'un composé au sein de 100 mL d'une solution.

En tout cas, les résultats ont été très encourageants et les expérimentations doivent se poursuivre pour affiner les conditions de traitement et de stockage pour l'obtention des meilleurs résultats possibles.

3.2 Déclenchement des mécanismes de défense par *Pseudomonas* sp. (Murugan & Dhandapani, 2006)

Une équipe indienne a élicité les défenses de cultures de tomate pour la lutte contre les mineuses (*Liriomyza trifolii*) et aleurodes (*Bemisia tabaci*) en inoculant les graines ou en pulvérisant les jeunes plantes avec une suspension contenant *Pseudomonas fluorescens*.

Il s'agissait en fait d'acquiescer des références sur les comportements de ces insectes sur des plantes antérieurement élicitées et qui continuent de l'être lors de leurs attaques.

En effet, l'hypothèse était la suivante : une inoculation avec la bactérie *Pseudomonas* sp. peut limiter les dégâts causés par le premier ravageur arrivé, sa propre attaque servant à amplifier et propager le signal de défense dans la plante qui est ainsi encore mieux parée lors de l'attaque du deuxième ravageur.

Les aleurodes s'intéressant plus aux jeunes plants de tomates, ils sont considérés comme étant les premiers ravageurs. Puis, les mineuses sont les insectes contre lesquels les plantes devraient être le mieux parées.

Cette hypothèse a été testée et approuvée suite à des comptages d'œufs et de piqûres sur les feuilles mais aussi suite à des analyses biochimiques mesurant la teneur en protéines de défense des plantes à divers endroits pour bien vérifier que la réponse est systémique. Une inoculation par *Pseudomonas* sp. permettrait donc de protéger les plantes de tomate contre aleurodes et mineuses si ces ravageurs surviennent dans la culture l'un à la suite de l'autre. Ici, *Pseudomonas* sp. n'est pas vraiment un SDN mais plutôt un outil de lutte biologique, étant un organisme vivant à part entière. Son action est tout de même citée ici car il a pour effet chez la plante d'éliciter la production de protéines PR.

3.3 Les flagellines

La flagelline est un constituant du flagellum de bactérie, élément nécessaire à leur mobilité. Des études ont montré que la flagelline constitue un éliciteur efficace sur cellules de tabac, tomate et *Arabidopsis* sp.

C'est une protéine constituée de domaines N et C-terminaux très conservés et d'une partie centrale hypervariable. Etant donné ces caractéristiques, différents peptides issus des régions terminales conservées ont été testés sur cellules végétales et le peptide flg22 s'est montré encore plus puissant que la flagelline entière en tant qu'éliciteur. Par contre, la protéine flg22 est reconnue par des récepteurs qui sont codés par un seul gène, cela signifie que la moindre mutation concernant ce gène compromet la reconnaissance de l'éliciteur par la plante.

Par ailleurs, il a été constaté que flg22 déclenche les réactions de défenses de dicotylédones mais semble inefficace sur les monocotylédones (Felix *et al.* 1999 cité par Fellbrich *et al.* 2002). Par exemple, des cellules de riz reconnaissent la flagelline mais il semble que les propriétés structurales du flg22 soient différentes de celles d'une molécule capable de déclencher la mise en place de défenses.

4. Les SDN à base d'extraits de plantes

4.1 L'extrait de fenugrec

■ Présentation

Le fenugrec (*Trigonella foenum graecum*), plante de la famille des légumineuses, est utilisé de façon ancestrale dans l'alimentation humaine. Une substance active naturelle, la diosgénine, a été tirée des graines et représente à elle seule une préparation commerciale homologuée en France, le Stifénia® détenu par la société SOFT (Martinez & Clergue, 2006).

■ Mode d'action

Cet extrait naturel agit par potentialisation des mécanismes de défense et permet donc de ne pas déclencher immédiatement après pulvérisation et inutilement les mécanismes de défense des plantes en dehors de la présence des parasites.

■ Cadre réglementaire et toxicologique

Le produit Stifénia, constitué de fenugrec purifié, bénéficie début 2009 d'une autorisation de mise en marché provisoire (n° AMM 2050030). Son homologation porte sur l'oïdium de la vigne à une dose de 1,5 kg/ha même en agriculture biologique (site Internet e-phy). Sa persistance d'action est de 8 jours.

Au niveau toxicologique, le Stifénia est non toxique pour la faune et la flore et, employé sur vigne, il ne crée pas de résidus dans le vin.

Exemple d'expérimentations portant sur l'extrait de fenugrec (Martinez & Loison, 2006)

Les réactions de défenses induites par l'application du Stifénia® ont été étudiées pour vérifier que son mode d'action correspond bien à la description scientifique de la potentialisation.

D'abord, les teneurs en principales molécules impliquées dans les réactions de défenses de la vigne : peroxyde d'hydrogène, acides salicylique et jasmonique, resvératrol ainsi que et l'activité des chitinases ont été mesurées. Les résultats ont montré que les taux de ces molécules dans les plantes traitées et sans oïdium étaient les même que ceux des plantes témoins. Seule une mise en alerte de la plante est enregistrée 60 minutes après pulvérisation : il s'agit de l'activation d'enzymes phosphorylant les protéines MAPkinases (Mitogen Activated Protein kinases). Ce mécanisme est effectivement connu dans la signalisation moléculaire conduisant à la résistance des plantes. Le processus s'interrompt et reste en état d'alerte jusqu'à une attaque du pathogène.

Un burst oxydatif est constaté 8 heures après une infection par l'oïdium puis s'ensuit une cascade d'évènements biochimiques. Les plantes traitées au Stifénia® ont en fait une sensibilité accrue aux signaux transmis par l'acide salicylique et l'acide jasmonique : des doses 6 fois moins élevées en acide salicylique et 10 fois moins élevées en acide jasmonique induisent une réaction de défense chez les plantes traitées de même amplitude que chez les plantes témoins (essais effectués avec une solution au jasmonate de méthyle au 100^{ème} et à des doses de 100 et 800 µM d'acide salicylique soient des doses de 0,014 à 0,11 g/l - se référer au tableau des équivalences p. 69.). Ainsi, la réponse est bien plus rapide en cas d'infection. Par exemple, le Stifénia® induit en cas d'attaque une forte augmentation du taux de resvératrol, composé polyphénolique et antioxydant, principale phytoalexine chez la vigne. Il en est de même pour l'activité des chitinases.

Des tests ont été réalisés en laboratoire et au champ par la même équipe de recherche et les résultats ont été concluants dans les deux cas. Ils ont révélé tout de même que les applications de Stifénia® étaient plus efficaces sur les plantes très sensibles par rapport aux cépages naturellement résistants et qu'elles doivent être renouvelées tous les 10 jours jusqu'au stade floraison (soit 3 à 4 applications). Après floraison, les traitements à base de soufre sont repris.

En termes de chiffrage :

- l'efficacité du Stifénia® sur l'intensité d'attaque sur les feuilles est voisine de 76 % par rapport aux vignes témoins ;
- sur une campagne, un traitement au Stifénia® puis au soufre procure la même protection qu'un traitement 100 % soufre avant et après floraison ;
- enfin, avant floraison, un traitement au Stifénia permet une meilleure efficacité du traitement au soufre en comparaison avec l'absence de traitement préliminaire.

Selon la société distributrice du Stifénia®, l'efficacité de ce produit, qui doit être appliqué en préventif, est de 50 à 60 % en moyenne (Delpech, communication personnelle, 2008).

4.2 L'extrait de renouée de Sakhaline

■ Présentation et extraction de la matière active

Le broyage des feuilles séchées de la renouée de Sakhaline (*Reynoutria sachalinensis*) puis une extraction par un mélange alcoolique ou par de l'éthanol permettent d'obtenir la physcione, substance active principale de cette plante (AFPP, en ligne).

■ Mode d'action

La renouée de sakhaline a un effet prouvé sur la synthèse de flavonoïdes et de phytoalexines protégeant en particulier le concombre des attaques de mildiou (*Pseudoperonospora cubensis*) (Treutter, 2006). Konstantinidou-Doltsinis *et al.* (2006) ont fait le point sur les résultats d'expérimentations menées depuis 1990 et il est apparu que l'extrait de renouée de Sakhaline, appliqué en préventif, fournissait des résultats satisfaisants contre l'oïdium du concombre, de la tomate et du bégonia.

■ Cadre réglementaire

Le Milsana[®], produit à base de *Reynoutria sachalinensis* a été breveté par la compagnie BASF. Ce brevet a ensuite été racheté par deux sociétés, l'une allemande et l'autre nord-américaine :

- en Allemagne, la société Dr. Schaette AG fabrique et distribue la formulation Milsana[®] VP 2001 en tant que fortifiant des plantes (cultures légumières et ornementales sous serre et cultures céréalières) ;
- aux Etats Unis, KHH Bioscience a homologué Milsana[®] VP 1999 et le distribue en tant que bioprotecteur de plantes.

■ Essai d'efficacité sur tomate

L'équipe de Konstantinidou-Doltsinis a mené les essais entre 1999 et 2003 afin d'évaluer l'efficacité du Milsana[®] contre le champignon *Leveillula taurica*, un oïdium de la tomate sous serre en Grèce.

D'abord, des tests *in vitro* ont montré que le Milsana[®] possédait en fait un effet direct sur la germination de conidies.

Ensuite, en conditions sous serre, des solutions de concentration de 0,2 à 2 % v/v ont été appliquées à intervalles de 7 jours. Sur 4 des 5 essais mis en place, le Milsana[®] a entraîné une baisse de la maladie de 42,2 à 64,6 % (après évaluation de la surface foliaire infectée) et il s'est avéré que plus la dose apportée était forte, plus le Milsana[®] était efficace. Enfin, le produit s'est montré moins efficient dans les cas de pression fongique très élevée.

Lors de comparaisons avec d'autres produits commerciaux, le Milsana s'est montré significativement moins efficace qu'un produit systémique utilisé en production conventionnelle mais il est finalement tout aussi puissant qu'une préparation à base de soufre autorisée en agriculture biologique. Etant lui-même utilisable en agrobiologie, il pourrait donc être utilisé alternativement avec des produits soufrés ou même avec des produits systémiques en cas de pression peu élevée. Cependant, une autre étude menée sur l'oïdium du concombre a montré que des apports réguliers de Milsana[®] n'étaient pas suffisants pour éviter la maladie à la différence d'un traitement à base de soufre (La torre *et al.* 2004).

Le Milsana a été également étudié contre l'oïdium de la tomate causé par *Oidium neolycopersici* en France par l'INRA et le Ctifl. L'équipe de Trottin-Caudal (2004) a mené des essais sur cultures de tomates sous serre pendant 3 années (de 1999 à 2001) pour déterminer le potentiel du Milsana[®] VP 1999 et Milsana[®] VP 2001. Dans des conditions de pression plus ou moins fortes, des applications des 2 produits dans les 7 jours précédant l'attaque ont permis de protéger les plantes à 95 – 99 %. Si le produit avait été appliqué dans les 14 jours, la protection atteignait 80 à 95 % selon les conditions d'essais. En outre, la protection fournie par des pulvérisations réalisées tous les 7 jours est relative à celle fournie par un fongicide de référence (pourcentages d'efficacité non significativement différents).

Cependant, il a été constaté que les zones non traitées des plantes restaient sensibles aux pathogène indiquant l'absence d'effet systémique de la part de ce produit.

4.3 Essais de stimulation des défenses à partir d'autres plantes

■ La bardane contre le botrytis de la tomate (He, Tian *et al.* 2006)

Une équipe de chercheurs chinois a travaillé sur l'utilisation d'un oligosaccharide issu de bardane (*Arctium lappa*) pour éliciter les défenses naturelles de la tomate face au botrytis. L'équipe a elle-même isolé l'oligomère du fructosane à partir de cultures de tissus racinaires de la plante. Le traitement a eu lieu avec une solution titrant à 0,6 % d'oligosaccharides. Les résultats ont montré que, dans les conditions d'expérimentation, cette substance permettait aux plantes traitées d'être significativement moins touchées que les plantes témoins mais pendant quelques jours uniquement. En effet, le taux de protection par rapport au témoin a atteint un pic de 31,2 %, 7 jours après inoculation. Il a ensuite diminué à 11,6 % au bout de 14 jours suivant l'inoculation.

Ce phénomène a été appuyé par des analyses moléculaires : de fortes activités enzymatiques ont été enregistrées entre 48 et 96 h après application de l'extrait. Une forte augmentation de la teneur en composés volatils à action inhibitrice a ensuite été constatée 5 jours après inoculation. Puis, cette teneur a rapidement diminué. Le niveau d'efficacité de la bardane paraît donc limité.

■ La rhubarbe et la bourdaine contre le mildiou de la vigne (Gindro, 2007)

Le Mildiou, *Plasmopara viticola*, est l'une des principales maladies de la vigne. En Suisse, selon les conditions climatiques, la lutte nécessite l'application préventive de huit à dix traitements fongicides. Ainsi, l'équipe de Gindro (2007) a examiné 21 produits quant à leur effet fongicide ou éliciteur face à ce pathogène. En effet, les phytoalexines stilbéniques éventuellement produites par la vigne ont un effet biocide sur le mildiou, et il s'agit particulièrement des viniférines et du resvératrol.

Deux extraits de plantes se sont avérés intéressants suite à l'élicitation qu'ils ont déclenché : la racine de rhubarbe et l'écorce de bourdaine.

Matériel et méthode

Les différentes applications se sont déroulées sur des vignes de la variété Chasselas au stade 15 feuilles, conduites en conditions contrôlées. L'inoculation artificielle avec *P. viticola* a eu lieu 24 h après et les observations, 48 h après. Ces observations consistaient à quantifier la production de callose ainsi que le nombre de sporanges sur les feuilles. Des analyses de la production de stilbènes (picéide, resvératrol, viniférines) par CLHP (chromatographie en phase liquide haute performance) ont été aussi réalisées avec ou sans inoculation.

Résultats obtenus

Hors inoculation, l'extrait de rhubarbe à des doses de 0,5, 1 et 5 % a induit une accumulation significative de stilbènes proportionnel à la dose, ce phénomène a persisté 10 jours puis la teneur a fortement chuté au 11^{ème} jour. D'autre part, la dose de 5 % a provoqué des dessèchements et des nécroses des feuilles mais sans systémie.

Les extraits de bourdaine aux trois doses ont également induit une forte augmentation des teneurs en stilbènes mais seulement après inoculation. La bourdaine a donc un effet de potentialisation des mécanismes de défense.

Avec les deux extraits et à chacune des doses, la sporulation du mildiou a été empêchée.

Ces résultats ouvrent une nouvelle fois une piste de travail, mais il s'agirait de définir dans un premier temps les molécules issues de ces extraits qui possèdent l'effet éliciteur. En effet, la standardisation de ces extraits sera indispensable pour songer à planifier une lutte maîtrisée en conditions naturelles.

En remarque, l'acide gallique a notamment fait partie des produits expérimentés. L'acide testé était issu d'une production de synthèse mais il se trouve à l'état naturel dans les feuilles de thé ou de sumac et dans l'écorce de chêne. Il a été expérimenté aux doses 2,5, 5 et 7,5 % et les analyses ont montré qu'il a induit une production de stilbènes sur une courte durée, insuffisante pour inhiber le développement du mildiou. Autrement, il a présenté un bon effet fongicide direct.

En 2006, Krebs *et al.* ont évalué l'effet d'extraits de racine de rhubarbe et d'écorce de bourdaine contre le mildiou (*Phytophthora infestans*) de la pomme de terre. Dans cette expérimentation, aucun protocole visant à déterminer l'action de ces deux extraits sur les plantes n'a été mis en place, seule l'efficacité des applications contre la maladie a été évaluée.

Des applications de suspensions aqueuses contenant des extraits de plante se sont montrées très efficaces, plus que les extraits éthanoliques. En conditions contrôlées, la rhubarbe à 2,5 % couplée à un mouillant a diminué les attaques de 80 %. La bourdaine à 5 % a offert la même efficacité, non significativement différente de l'efficacité obtenue avec un fongicide à base de cuivre.

Lors des essais en plein champ, ces deux préparations testées n'ont pas atteint l'efficacité du procédé à base de cuivre mais ont tout de même présenté un effet positif. En tout cas, ces découvertes ont mis en évidence l'effet des facteurs environnementaux sur l'efficacité de préparations naturelles : les rayons UV, ou encore les micro-organismes qui dégradent les substances pulvérisées sont autant de facteurs à prendre en compte pour exploiter le réel potentiel des SDN et autres préparations naturelles.

■ L'extrait de pavot à panicule (*Macleaya cordata*) (Copping & Duke 2007)

L'extrait de pavot à panicule (*Macleaya cordata*) est homologué aux Etats-Unis par la société Camas en tant que fongicide contre les oïdiums, l'alternariose et la septoriose. *M. cordata* contient plusieurs alcaloïdes dont la sanguinarine, la chélerythrine, la protopine et l'allocryptopine. Les deux premières molécules représentent les deux matières actives du produit commercialisé, Qwel®, contenant l'extrait de plante à une concentration de 1,5 %. Le mode d'action de ces molécules n'est pas encore bien connu mais il semble que ces molécules agissent en tant que SDN en favorisant l'accumulation de phytoalexines et en provoquant une résistance systémique acquise.

5. Les préparations à base d'algues

5.1 La laminarine, oligosaccharide issu des algues brunes

■ Présentation et extraction de la molécule

La laminarine, oligosaccharide dont le nom chimique est (1-3)- β -D-glucane, est obtenue par un processus d'extraction par hydrolyse acide effectué sur l'algue *Laminaria digitata*, puis par séparation du retentât par filtration (AFPP, en ligne).

■ Mode d'action

Il a été observé sur le blé, le tabac et la vigne que l'application de laminarine induit une cascade de réponses de défenses telles que la libération de peroxyde d'hydrogène et une activation des voies métaboliques des phénylpropanoïdes et des oxylipines menant à une accumulation d'acide salicylique et d'acide jasmonique et par conséquent à la production de protéines PR et de phytoalexines (Esnault *et al.*, 2005). De plus, des études menées sur vigne ont abouti à l'hypothèse que la laminarine provoquait certainement une potentialisation de la plante (Trouvelot, Varnier *et al.* 2008).

■ Cadre réglementaire et toxicologique

Cette substance représente la matière active de deux produits phytosanitaires homologués en France et distribués par la société Goëmar (site Internet E-phy).

Le premier produit Iodus® 2 Céréales (n° AMM 2020021), de concentration de 37 g/l, est autorisé pour la lutte contre l'oïdium et la septoriose du blé à une dose de 1l/ha de bouillie et contre l'oïdium et l'helminthosporiose de l'orge à une dose de 0,75 l/ha de culture.

La deuxième spécialité, Iodus® 2 cultures spécialisés (n° AMM 2080019) contenant la laminarine à 45 g/l, a eu l'homologation courant 2008 pour la protection des fraisiers contre l'oïdium. La dose d'emploi a été fixée à 0,75 l/ha de culture.

Par ailleurs, comme le souligne l'AFPP, ce produit est dispensé de classement toxicologique et écotoxicologique et fait partie des rares produits phytosanitaires utilisés en pulvérisation à être dispensés de délai de rentrée dans la parcelle après application. De plus, il n'a pas non plus de limite maximale de résidus fixée ni de délai avant récolte.

■ Exemples de travaux réalisés

Des perspectives positives pour la protection du blé

Actuellement, la lutte contre la septoriose du blé a lieu avec de grandes difficultés suite à l'apparition de souches de *Septoria tritici* résistantes aux fongicides actuels qui sont à base de strobilurine. La laminarine, à l'essai en laboratoire, a prouvé une efficacité constante quelle que soit la souche du champignon (Esnault *et al.* 2005).

Au champ, des tests ont eu lieu en Irlande et en Grande-Bretagne en 2004. La laminarine a été incluse dans un programme de lutte comprenant également des matières actives synthétiques, ce SDN étant appliqué en tant que premier traitement effectué à la dose homologuée. Ce programme a été comparé à d'autres 100% chimiques et il s'est avéré que chaque protocole a eu la même efficacité de protection sans avoir une influence négative sur le rendement. Des essais réalisés en France en 2005 ont corroboré ces résultats.

La possibilité d'alternance des modes d'action est essentielle pour conserver à terme des outils de protection efficaces et la laminarine offre cette possibilité et s'inscrit de fait parmi les moyens pertinents pour élaborer des stratégies de lutte dans un contexte de résistance installée. Selon l'IBMA (International Biocontrol Manufacturers Association), cette préparation, suivant les situations, permet de supprimer 30 à 50 % des fongicides de synthèse utilisés (Damoiseau, 2008).

Protection des vignes et du tabac en France

En 2000, il a été montré que la laminarine protégeait efficacement des pieds de tabac contre la bactérie *Erwinia carotovora* ainsi que le virus de la mosaïque (Klarzynski *et al.* 2000). Puis, en 2003, l'équipe d'Aziz a trouvé que la laminarine pouvait diminuer les attaques de *Plasmopara viticola* et de *Botrytis cinerea* sur vignes, résultats confirmés en 2008 par Trouvelot, Varnier *et al.*

Protection des plantes ornementales en France

Lors d'essais menés par le réseau Astredhor, la laminarine a été testée sur plusieurs couples plante/pathogène dans des conditions réelles de production (Stapel, Deogratias *et al.* 2006).

Dans la majorité des essais, une application de solution contenant de 1 à 3 ml/l en laminarine à 15 jours d'intervalle (3 à 4 applications) a été respectée et en cas d'infestation artificielle, les produits ont été appliqués au moins une semaine avant l'inoculation.

Les résultats sont les suivants :

Tableau 1 : étude sur les effets de la laminarine sur diverses cultures ornementales

Plante hôte	Pathogène	Dose	Constat
Cyclamen (<i>Cyclamen persicum</i> x)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	1 ml/l	La laminarine a une assez bonne efficacité lors d'une pression parasitaire faible mais qui ne dure que 25 jours environ après inoculation. De plus, cette substance n'apporte pas une protection efficace en cas de forte attaque.
Chrysanthème (<i>Dendranthema</i> x <i>grandiflorum</i>)	rouille blanche (<i>Puccinia horiana</i>)	1 ml/l	Le produit n'a pas vraiment protégé les plantes mais le déroulement de l'essai a été perturbé.
Pensée (<i>Viola</i> x <i>wittrockiana</i>)	<i>Pythium ultimum</i>	1l/ha	Bonne maîtrise du pathogène, la protection décroît au fil des semaines mais a été meilleure que le produit chimique de référence dans l'essai.
Pâquerette (<i>Bellis perennis</i>)	Rouille (<i>Puccinia distinct</i>)	3 ml/l	La laminarine a permis de lutter efficacement contre la rouille. Un mois après l'apparition de la maladie, la qualité commerciale des plantes n'a pas été affectée. Un effet « variété » (deux var. testées) a été constaté.
Laurier de Caucase (<i>Prunus lauro-cerasus</i> 'caucasica')	Nécrose bactérienne (<i>Pseudomonas syringae</i> pv.)	1,5 et 3 ml/l	Aux deux doses testées, la laminarine n'a fourni qu'une protection partielle.
Géraniums (<i>Pelargonium hortorum</i> et <i>hederaefolium</i>)	Botrytis cinerea	1,2 et 2,4 ml/l	Le produit n'a pas vraiment protégé les plantes mais les plantes étaient peu distancées et les conditions étaient très favorables au développement du champignon.

5.2 Le TTF5, cocktail d'extraits d'algues, de fertilisants et d'acides aminés (Pajot, Maurice et al. 2007)

Le TTF5 est une préparation associant des extraits d'algues, des matières fertilisantes et des extraits d'acides aminés. Ce « cocktail » a été développé par la société Tribo Technologies. Il est actuellement autorisé comme fertilisant en France sous le nom de Sémafort® mais il posséderait également des effets sur la stimulation des défenses naturelles. En effet, des essais sur tabac menés au CNRS de Strasbourg ont montré que ce produit stimulent la production de protéines PR. En remarque, aucun des composants du TTF5 (à savoir extrait d'algue ou matière fertilisante ou extrait d'acides aminés) ne provoque seul cette stimulation, l'action de cette préparation paraît donc reposer sur la mise en synergie de plusieurs constituants.

D'autres essais menés par le laboratoire BBV ont détecté une activité intéressante de ce produit contre l'oïdium du fraisier : le TTF5, appliqué à une dose de 0,75 % v/v a fourni une efficacité de protection de 88 % par rapport aux plantes témoin traitées à l'eau. Sur les feuilles formées après le traitement, ce taux de protection est de 60 %. Il a été vérifié que le produit n'a pas d'effet fongicide direct sur la germination des spores mais qu'il agit sur le métabolisme de la plante (expression de protéines PR intervenant dans les voies de l'acide salicylique et de l'éthylène). Enfin, des essais préliminaires sur vigne ont montré un effet contre le mildiou.

6. Les SDN synthétiques

Les SDN créés de manière synthétique n'ont pas pour propriété de simuler la reconnaissance d'un pathogène par les récepteurs membranaires de la plante mais interviennent directement dans la cascade de signaux moléculaires. Ces SDN sont donc généralement des molécules analogues à l'acide salicylique et à l'acide jasmonique.

6.1 L'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA)

L'acide salicylique (SA) a la faculté de déclencher une résistance systémique acquise à travers la plante. Or, SA est peu utilisé en application exogène et les chercheurs lui préfèrent des formes analogues tel l'INA ou l'acibenzolar-S-méthyl (§. 6.2). En effet, SA n'est par exemple pas efficace pour éliciter les défenses des plantes face aux maladies racinaires car, lors d'un traitement avec SA, la quantité de SA libre absorbée dans les racines est considérée comme trop faible pour avoir un éventuel effet sur les processus de défense, d'autant plus que SA se dirige préférentiellement vers les parties aériennes. (Molinari & Loffredo, 2006).

L'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) a été testé pour la protection de tomates (*S. lycopersicum* cv. Marmande) contre le nématode *Meloidogyne javanica* par Sanz-Alferez et al. (2008). Une solution contenant l'INA à 1,25 mM a été appliquée sur les racines (quantité de 100 ml) ou en pulvérisation sur les feuilles (quantité de 50 ml) de plantes portant 3 étages de feuilles. L'inoculation par les nématodes a eu lieu 2 jours après.

10 jours après inoculation, l'INA a permis de diminuer la formation de gales de 20 % par rapport aux plantes témoin infectées, cette substance a donc présenté un effet mais qui est resté partiel.

Des tests moléculaires ont été réalisés et ont montré qu'en fait, *Meloidogyne* avait la capacité de bloquer l'expression de gènes de certaines protéines PR. L'INA a donc bien un rôle inducteur de la RSA mais cette réponse est inhibée à la suite de l'inoculation avec les nématodes. Ces essais ont été également menés avec l'application d'ASM (voir partie 6.2) et les conclusions ont été les mêmes avec quelques différences sur les taux d'expression des gènes de défense. Ce phénomène a été confirmé par une autre équipe de chercheurs étudiant l'infection d'*Arabidopsis* par différents genres de nématodes. Ces travaux semblent indiquer que la protection des plantes par l'induction de leurs défenses naturelles est inefficace pour la lutte contre les nématodes. Pourtant, des études dans les années 1980 ont défini l'effet nématostatique de phytoalexines de différentes natures à effet variable sur tel ou tel genre de nématode (Dijan-Caporalino et al. 2002). De plus, des essais sur plants de banane menés au CIRAD avec Stifénia® semblent présenter un bon potentiel (Delpech, communication personnelle, 2008).

6.2 L'ASM, acibenzolar-S-méthyl

■ Présentation et mode d'action

L'acibenzolar-S-méthyl, ASM, appartient à la famille des benzothiadiazoles (BTH) et représente un autre analogue structural de l'acide salicylique.

Des analyses d'immunologie ont démontré que des plantules de chou-fleur traitées avec l'ASM ont synthétisé des protéines PR-2 (β -1,3-glucanases) indépendamment de la présence du pathogène. De même, il a été prouvé que des chrysanthèmes traités ont accumulé des peroxydases et des glucanases (Stapel, Guerrand *et al.* 2005).

D'autre part, il a été constaté par Benhamou et Picard (2000) que l'ASM permettait sur tomate la formation de barrières structurales et que ce phénomène représentait un mécanisme prédominant dans la résistance. Par contre, sur concombre, un traitement à l'ASM semble favoriser la synthèse de phytoalexines et/ou une conversion des substances phénoliques préexistantes. L'effet de l'ASM ne provoque donc pas les mêmes réactions selon l'espèce traitée.

■ Cadre réglementaire et toxicologique

L'ASM est retrouvé à 50 % dans un produit phytosanitaire homologué en France : le Bion® 50 WG de Syngenta. (n° AMM 9600526). Les usages autorisés concernent :

- le traitement du blé contre l'oïdium à une dose de 0,06 kg/ha.
- le traitement de la tomate contre la bactériose à une dose de 0,05 kg/ha.

Au niveau toxicologique, cette spécialité est considérée comme irritante et dangereuse pour l'environnement (site Internet e-phy).

L'ASM est également retrouvé à moindres doses dans des préparations fongicides commerciales contenant du méfénoxam ou du fenpropidine. Par exemple, la spécialité Bion® MX de Syngenta contient 4 % d'ASM et 40 % de Mefenxan).

Syngenta a également obtenu pour la même préparation chimique des homologations aux Etats-Unis. Le produit, nommé Actigard® 50 WG, est ainsi utilisable sur légumes à feuilles, tabac, cultures de tomates et oignons.

■ Les travaux réalisés avec l'ASM

L'ASM a été au centre de nombreuses expérimentations portant sur différentes cultures et sur différents pathogènes. La plupart des résultats sont très positifs.

Une bonne efficacité contre les champignons pathogènes

La spécialité Actigard® homologuée aux Etats-Unis a été testée en 2004 par Bishnoi *et al.* Il s'agissait d'évaluer l'effet de ce produit sur la maîtrise d'*Alternaria solani* sur tomate et de *Leptosphaeria maculans* sur cultures de colza de printemps à différentes concentrations.

Sur tomate, il a été montré qu'une concentration d'Actigard à 23,6 g/ha (correspondant à la moitié de la dose homologuée en France) permettait de diminuer l'apparition de maladie mais pas de manière significative. Une dose de 53,2 g/ha apporte par contre une protection significative contre *Alternaria solani*.

Sur colza de printemps cependant, aucun effet contre le développement de la maladie n'est significatif. Seuls des bénéfices sur la croissance et le rendement des plantes a été démontré.

Les auteurs de l'article ont souligné que ces résultats vont à l'encontre d'autres résultats obtenus par d'autres équipes de chercheurs. Ce constat met en avant le fort impact de l'environnement et des caractéristiques du sol sur l'action de ce genre de produit. Par ailleurs, un effet « variété » a été mis en évidence lors de ces tests.

Des essais ont eu lieu en Italie sur tomates et aubergines pour évaluer la protection offerte par ASM contre la maladie des racines liégeuses causée par *Pyrenochaeta lycopersici* et la verticilliose causée par *Verticillium dahliae*. Ce sont deux champignons du sol.

Les essais sous serre aux doses recommandées par le fournisseur (12,5 mg matière active/l solution) ont mis à jour une forte phytotoxicité de l'ASM sur les deux cultures quelque soit le mode d'apport (trempage des racines de jeunes plants, trempage des plantes, pulvérisation). Cette toxicité s'est manifestée par une chlorose des feuilles et un ralentissement de la croissance.

En conditions de plein champ, ASM pulvérisé à 10, 20 et 30 jours après la plantation a permis sur des cultures de tomate de 100 jours, de diminuer la maladie des racines liégeuses de 63 % (en terme de surface racinaire). Ce résultat est équivalent à ceux obtenus avec des fongicides chimiques sauf ceux contenant des azoxystrobines qui fournissent de meilleurs résultats encore.

En ce qui concerne la protection des aubergines contre la verticilliose, l'ASM n'a eu aucun effet à la différence des fongicides. Ainsi, tandis qu'il a bien été montré un effet éliciteur sur tomates à la dose recommandée, des tests sur aubergines avec des doses supérieures devraient être réalisés pour mieux analyser l'échec du traitement à l'ASM. De plus, d'autres périodes et cadences de pulvérisation devraient être testées en étudiant les effets biochimiques de l'ASM (Bubici *et al.* 2006).

L'ASM a été étudié pour la protection du colza d'hiver (*Brassica napus L.*) contre le phoma (*Leptosphaeria maculans*), champignon responsable du chancre. Cette évaluation a été menée en même temps que celle d'une forme avirulente du phoma (voir partie 2.2).

L'application foliaire d'ASM en automne avant une inoculation avec le phoma a permis de diminuer les lésions sur les feuilles des jeunes plantes, et ce pendant les trois années consécutives d'essais.

Pour la période d'avril à mai, à quelques semaines de la récolte et lorsque les attaques du phoma augmentent beaucoup, l'ASM a permis une baisse de la sévérité de la maladie pendant 2 des 3 années étudiées.

Ces résultats sont très encourageants mais un traitement uniquement à base d'ASM ne permet pas de protéger de manière totale la culture jusqu'au moment de la récolte. Ce traitement devrait donc faire partie de la stratégie de lutte globale contre le chancre du colza (Liu *et al.* 2007).

Ensuite, l'effet de l'ASM a été évalué pour la protection des betteraves sucrières contre la cercosporiose provoquée par le champignon *Cercospora beticola* (Marinello *et al.*, 2006). La formulation commerciale de Syngenta a été utilisée pour les tests à une concentration de 60 mg/l d'eau distillée.

Des essais en serre ont été menés afin d'effectuer des analyses biochimiques. Le traitement n'a eu lieu que sur une feuille par plante. 4 jours après, les plantes ont été inoculées au niveau des feuilles non traitées. Trois autres modalités ont été testées : aucun traitement, SDN seul, inoculation seule.

Les analyses ont montré que toutes les plantes traitées à l'ASM, inoculées ou non ont augmenté leur activité peroxydase dès le 7^{ème} jour après traitement à la différence des autres modalités.

Quant aux chitinases, elles sont synthétisées très rapidement par les plantes non traitées et inoculées pour décroître au bout de 4 jours. Au sein des plantes traitées, l'activité chitinase a augmenté progressivement pour rester stable dans le temps.

En conditions réelles, la solution d'ASM a été pulvérisée à 15 jours d'intervalle soit 5 fois tout au long de la culture. Cette modalité a été comparée à un témoin sans traitement et à des plantes traitées avec un produit et des doses conventionnelles. L'inoculation a eu lieu de manière naturelle.

Les résultats ont montré que le traitement à l'ASM s'est avéré aussi efficace que le traitement conventionnel.

Enfin, L'ASM a également été étudié par le réseau Astredhor pour une éventuelle utilisation sur les plantes ornementales. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2 (STEPP 2005, 2006 & 2007 ; Deogratias, 2007 ; Stapel, Deogratias *et al.* 2006).

Tableau 2 : effet de l'ASM sur la protection de diverses plantes ornementales.

Plante hôte	Pathogène	Dose	Constat
Cyclamen (<i>Cyclamen persicum</i> x)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cyclaminis</i>	0,07 g/l	L'ASM a montré une assez bonne efficacité qui s'est maintenue pendant 25 jours. En cas de contamination parasitaire forte, l'ASM s'est avéré peu efficace.
Chrysanthème (<i>Dendranthema x grandiflorum</i>) (tests en conditions contrôlées uniquement)	Rouille blanche (<i>Puccinia horiana</i>)	0,1 g/l	3 applications sur un mois puis mise en contact avec des plantes inoculatrices pendant 13 jours : L'ASM a montré une efficacité de 60 % mais le traitement a « lâché » 35 jours après l'infestation où la pression parasitaire était très forte.
	Rouille brune (<i>Puccinia chrysanthemii</i>)	0,1 g/l	L'ASM a montré une efficacité de 50 %.
Pâquerette (<i>Bellis perennis</i>)	Rouille (<i>Puccinia distinct</i>)	0,075 g/l	L'évolution de la maladie des plantes traitées a été bien moins rapide que sur le témoin et un mois après l'apparition de la maladie, ces plantes ont toujours une qualité commerciale correcte.
Céranium (<i>Pelargonium hortorum</i> P. <i>hederaefolium</i>)	<i>Botrytis cinerea</i>	0,025 g/l	L'ASM s'est montré phytotoxique dans ce cas où un traitement a été effectué tous les 15 jours avec un total de 5 traitements.
Laurier de Caucase (<i>Prunus laurocerasus</i> 'caucasica')	Nécrose bactérienne (<i>Pseudomonas syringae</i>)	Tests à 0,2 g/l et 0,4 g/l	De bons résultats ont été obtenus avec la dose de 0,4 g/l.

En remarque, les essais en laboratoire réalisés par le BBV ont montré que, suite à une pulvérisation d'ASM, des plantules de chou-fleur ont perdu 30 % de leur poids frais 7 jours après, ce qui prouve bien que l'élicitation directe consomme de l'énergie.

Lutte contre les maladies bactériennes

Pour lutter contre le dépérissement bactérien de l'oignon causé par *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, des applications d'ASM ont été testées au champ et en conditions climatiques contrôlées (Lang *et al.*, 2007). Il est apparu que l'ASM utilisé en préventif à une dose de 26,3 g matière active/ha (dose homologuée en France) et appliqué 2 fois à 7 jours d'intervalle diminuait les symptômes de 40 %. Une quinzaine d'applications de bactériophages, à un rythme bihebdomadaire, postérieures à l'application d'ASM permet de baisser de moitié la sévérité de la maladie par rapport au témoin. Les résultats ont donc suggéré que l'intégration de bactériophages et d'ASM pouvait être une alternative intéressante aux traitements conventionnels à base de cuivre contre le dépérissement bactérien de l'oignon, le problème majeur reste le coût de production qui est augmenté avec l'utilisation de cette méthode alternative.

Concernant l'application d'ASM seule, dans les conditions d'essais et aux Etats-Unis, de 2 à 4 applications d'ASM en préventif seraient 50 % plus onéreuses qu'un traitement à base de mancozèbe et d'hydroxyde de cuivre mais coûteraient 20 % moins cher qu'un programme avec des bactériophages (Gent & Schwartz, 2005).

Par ailleurs, l'ASM possède l'avantage de protéger les cultures contre d'autres maladies. Par exemple, aux Etats-Unis, l'ASM est déjà utilisé pour lutter contre le virus des tâches jaunes de l'iris.

Une certaine protection fournie contre les insectes suceurs-piqueurs

Lors d'essais sur la protection de plants de tomate cultivés en serre contre le puceron vert *Myzus persicae*, Boughton *et al.* (2006), ont testé l'harpine (partie 3.1) mais aussi l'ASM. Les doses testées d'ASM étaient de 0,07, 0,13 et 0,26 mM. Les applications ont eu lieu par pulvérisation jusqu'à saturation des feuilles.

D'abord, l'ASM n'a provoqué aucun phénomène de phytotoxicité et n'a pas eu d'influence sur la croissance des plantes. De plus, l'ASM a permis une réduction significative du nombre de pucerons ainsi qu'une baisse du taux de ponte sur les plantes traitées. Ces résultats sont venus appuyer d'autres essais effectués en 2004 et 2005.

La protection contre les suceurs-piqueurs étant habituellement induite par la voie de l'acide jasmonique, les phénomènes biochimiques provoqués par l'ASM ont donc été étudiés. Aucune augmentation de l'activité enzymatique des peroxydases et des polyphénols oxydases (permettant de rendre la plante indigeste) n'a été enregistrée, l'ASM n'a donc pas induit les voies de JA et a donc bien induit des voies dépendantes de l'acide salicylique. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre l'effet de l'ASM sur la protection des plantes face aux insectes suceurs-piqueurs.

Essai d'une protection polyvalente sur vergers de pommiers et poiriers (Brisset, Chartier *et al.* 2005)

L'ASM a été testé contre la tavelure du pommier et le feu bactérien en France par une équipes INRA-INH-Université d'Angers - Institut National d'Horticulture d'Angers.

Pour la lutte contre le feu bactérien causé par *Erwinia amylovora*, les tests ont d'abord été effectués sur des semis de pommier sous serre pulvérisés d'ASM puis inoculés dans des délais variables par une suspension bactérienne. Les résultats ont montré que la molécule exerçait une action protectrice de façon reproductible quel que soit le délai traitement-inoculation.

Puis au verger, les essais sur des arbres de 6 ans ont confirmé l'efficacité de cet inducteur contre le feu bactérien : deux applications à 14 et 7 jours ou 7 et 2 jours avant le stade F2 permettent de diminuer la fréquence des infestations de 40 à 50 %.

Contre *Venturia inaequalis*, facteur de la tavelure du pommier, des premiers tests ont été réalisés en cellule climatisée sur des plants greffés, sur deux années. L'efficacité de l'ASM s'est montrée partielle même si le pourcentage de feuilles tavelées a été significativement diminué par rapport au témoin.

Ensuite, au champ, les essais sur tavelure n'ont pas permis de tirer des conclusions mais les essais ont révélé l'intérêt d'ASM contre l'oïdium du pommier.

Lors des essais, les chercheurs ont souhaité évaluer l'impact de l'ASM sur le carpocapse du pommier, le puceron cendré et le psylle du poirier en effectuant des tests sur des pommiers de 2 à 3 ans cultivés en pot et des semis de poirier, pendant deux années. Il a été trouvé que l'ASM réduit les quantités de sucres solubles et d'acides aminés libres à la surface des arbres et cette modification a diminué de moitié l'atterrissage des femelles et de 60 % le nombre de pontes enregistrées. Il en est de même pour le puceron cendré qui voit son développement diminué. Enfin pour le psylle, l'ASM entraîne une réduction de fécondité des femelles et une modification du rythme de ponte. Les effets sont particulièrement marqués sur les plants en croissance. Cet aspect pourrait être étudié plus en profondeur.

Par ailleurs, l'induction des défenses systémiques en réponse à l'élicitation, si elle exige de la plante un investissement énergétique, ne semble pas avoir de conséquence sur la production ou la qualité des fruits.

En tout cas, ces résultats demeurent parcellaires et il reste prématuré d'envisager leur transfert vers une pratique professionnelle. Les conditions d'application (date d'application, durée d'action, influence variétale etc.) doivent notamment être affinées.

6.3 Le BABA (Acide β Amino-Butyrique)

■ Présentation et mode d'action

BABA est un acide aminé non protéique connu pour induire une résistance au sein de nombreuses plantes face à un large spectre de pathogènes et ceci par potentialisation (Kamble & Bhargava 2007)

Lors d'essais sur *Brassica juncea* (moutarde chinoise) pour la lutte contre *Alternaria brassicae*, il est apparu que la résistance induite par BABA n'était pas due à une augmentation de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique qui sont des molécules de signal. En fait, BABA amorce l'expression de deux protéines PR (PR1 et PDF1.2) qui sont normalement induites par les voies de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique (Kamble, Bhargava, 2007). Le BABA agit donc directement sur les voies du métabolisme secondaire.

D'autre part, BABA possède des caractéristiques supplémentaires par rapport à l'acibenzolar-S-méthyl. En effet la société BBV (Bretagne Biotechnologie Végétale), a montré que l'ASM et le BABA étaient très efficaces pour protéger des plantules de chou fleur et de tomate vis-à-vis du mildiou, respectivement *Peronospora parasitica* et *Phytophthora infestans*. Par contre, l'ASM est inefficace contre le mildiou de la laitue, *Bremia lactucae*, alors que BABA reste efficace (dans Bargain, 2005).

■ Les expérimentations menées sur BABA

A titre de premier exemple, BABA a apporté des résultats concluants pour la protection des cultures de pommes de terre contre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, champignon causant le mildiou des feuilles et des tubercules (Andreu *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, les fongicides appliqués protègent essentiellement les feuilles. Une seule spécialité protège directement les tubercules face à cette maladie économiquement importante. Les tests ont été effectués sur 2 années et sur 4 variétés différentes de par leur sensibilité à la maladie dont des tubercules ont été plantés dans des pots de 7 l. cultivés sous serres dans des conditions de températures et de lumière contrôlées.

4 applications de BABA à 4 kg/ha, à 15, 35, 55 et 75 jours après la sortie des graines n'ont fourni aucune protection sur le feuillage de la variété très résistante et de la variété très sensible. Par contre, les feuilles des variétés « modérément sensible » et « modérément résistante » ont été protégées pendant les 40 premiers jours mais ce n'est pas très durable. Les chercheurs ont émis l'hypothèse que le signal a été transmis vers les racines.

En effet, les tubercules ont été très bien protégés et les pulvérisations de BABA ont permis de récolter significativement plus de tubercules sains, sauf pour la variété naturellement résistante qui est à l'origine très protégée.

Les analyses immunologiques ont montré des inductions de protéases et glucanases augmentées suite à l'élicitation de BABA chez les plantes modérément sensibles et très sensibles.

Enfin, les détections de phytoalexines et composés phénoliques au sein de tranches de pommes de terre récoltées ont été très faibles. C'est après une inoculation artificielle que leur accumulation a été décuplée, ce qui confirme bien le phénomène de potentialisation induit par BABA (Andreu *et al.*, 2006).

Ensuite, les tests menés par le réseau Astredhor ont apporté des données très concluantes sur l'effet de BABA sur la protection des plantes ornementales vis-à-vis des maladies. Les taux d'efficacité ont été mesurés à 80 % contre les rouilles blanche et brune du chrysanthème pendant deux années de suite en conditions réelles de production avec des apports de BABA à 4 g/l (STEPP 2007).

Pour conclure sur les effets de BABA, le tableau 3 ci-dessous reprend les principaux résultats obtenus pour la protection des plantes grâce à cette molécule.

Tableau 3 : exemples de plantes exprimant une résistance contre différents pathogènes après traitement par le BABA (Pajot, 2005b ; Trouvelot *et al.* 2006)

Plante	Protection contre
Arabette (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Peronospora parasitica</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato, <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Plectosphaerella cucumerina</i> .
Chou-fleur (<i>Brassica oleracea</i>)	<i>Peronospora parasitica</i>
Maïs (<i>Zea mays</i>)	<i>Fusarium moniliforme</i>
Pois (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Aphanomyces euteiches</i>
Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Phytophthora infestans</i>
Tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>Hyaloperonospora tabacina</i> , virus de la mosaïque du tabac et <i>Phytophthora infestans</i> .
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> , <i>Botrytis cinerea</i>
Laitue	<i>Bremia lactucae</i>
Vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Plasmopara viticola</i>

■ Perspectives d'utilisation

Pour le moment, BABA reste une molécule de laboratoire à la différence de l'ASM et, malgré sa forte efficacité, cette molécule a un coût très élevé qui ne permet pas de fabriquer BABA en quantités industrielles (STEPP, 2007).

6.4 L'Acide jasmonique et son méthyle

■ Présentation

L'acide jasmonique (JA) et son dérivé plus actif, le méthyl-jasmonate (MeJA) peuvent être introduits dans la plante afin de déclencher les mêmes voies de synthèse que JA quand il est synthétisé par la plante. Comme JA n'intervient que dans une partie des mécanismes aboutissant à la mise en place de défenses par la plante, il reste important de tester l'effet d'applications exogènes pour vérifier qu'elles élicitent les « bonnes » voies face à telle ou telle agression.

■ Exemples de travaux réalisés avec JA et MeJA

Une protection fongique assez efficace (Belhadj *et al.* 2006)

MeJA appliqué sur des feuilles de Cabernet Sauvignon permet l'augmentation du nombre de transcrits codant différentes protéines PR et enzymes intervenant dans la biosynthèse de phytoalexines. De même, des applications de MeJA ont permis d'augmenter la tolérance de vignes face à *Erysiphe necator*, vecteur de l'oïdium. Ces résultats ont été obtenus à la suite des tests suivants :

- Un partie des essais a été menée avec des prélèvements foliaires réalisés 72 h. après le traitement de plantes entières avec une solution titrant à 5 mM⁴ de MeJA et 0,1% v/v d'un agent mouillant. Ces feuilles ont ensuite été inoculées avec *E. necator* en laboratoire et ont servi à la réalisation d'analyses moléculaires. Les résultats ont montré une protection efficace contre le champignon.
- Au champ, des pulvérisations de produits de concentration à 5 mM (0,67 kg/ha) ou à 15 mM (2 kg/ha) ont été réalisées tous les 7 à 10 jour, de la floraison à la véraison (soit 7 applications au total). La part de la surface foliaire infectée a été utilisée pour les comparaisons, incluant un témoin sans traitement et des plantes traitées au soufre. A la véraison, les plantes témoin ont montré un taux de surface contaminée de 43 %, alors qu'il n'était que de 10 et 12,5 % pour les plantes traitées au MeJA à respectivement 5 et 15 mM. Ce premier résultat montre qu'une concentration 3 fois plus élevée en MeJA n'est pas vraiment utile. Enfin, le traitement au soufre a été quand-même le plus efficace grâce à son effet curatif avec une surface contaminée de 0 %. Ces essais ont permis une fois de plus de montrer les effets éliciteurs du méthyl-jasmonate mais il est précisé une fois encore que le niveau d'induction varie selon le stress appliqué, la variété ou l'organe étudié.

Une protection bactérienne également encourageante (Luzzatto *et al.* 2007)

Les arums (*Zantedeschia aethiopica*) subissent une forte pression de la part de *Pectobacterium carotovorum* provoquant le pourrissement des plantes. Contre cette pourriture bactérienne, la protection des arums fait appel à des bactéricides à base de soufre, peu efficaces et phytotoxiques. Les antibiotiques, quant à eux, ne sont pas intéressants car ils peuvent être à l'origine de l'apparition de résistance en quelques générations seulement et d'ailleurs, ils ne sont pas autorisés en France. Donc pour le moment, le seul moyen de lutter contre *P. carotovorum* passe par des moyens prophylactiques et le choix de variétés résistantes.

Les SDN ASM, BABA et MeJA ont été soumis à des expérimentations. Ces tests ont permis de montrer qu'une élicitation des voies de l'acide jasmonique avaient des conséquences bien plus durables qu'une élicitation avec du salicylate ou BABA. Le protocole était le suivant : l'inoculation du pathogène a lieu sur des prélèvements cylindriques de feuilles élicités 24 h avant et placés sur substrat synthétique. Les mesures sont réalisées 24 h après inoculation soit 48 h après élicitation.

⁴ Pour obtenir des doses en grammes/litre, se référer au tableau page 69

Les résultats sont compilés dans le tableau 4.

Tableau 4 : des réponses différentes selon le type d'élicitation. Exemple avec la pourriture bactérienne de l'arum *Zantedeschia aethiopica*

Eliciteurs	ASM	BABA	MeJA
Concentrations des solutions testées	0,2, 5,5, 10 ou 25 mg/l	0,2, 5,5, 10 ou 25 mg/l	1, 10 ou 50 mM
Mode d'application	Trempage pendant 24 h	Trempage pendant 24 h	Pulvérisation foliaire
Effets sur l'apparition et la propagation des symptômes	Part de la surface infectée de 50 %, significativement réduite par rapport au témoin à toutes les concentrations.	Part de la surface infectée de 20% (différence significative par rapport au témoin).	Une solution de 10 mM bloque complètement l'apparition de la maladie : des cellules bactériennes sont présentes mais elles ne se développent pas.
Concentration de la solution optimale	10 mg/l (25 mg/l est moins efficace)	5 à 10 mg/l (25 mg/l est phytotoxique)	10 mM
Durabilité de l'effet	Seulement 24 h	Seulement 24 h	Jusqu'à 7 jours

En fait, les bactéries de *Pectobacterium carotovorum* ont une nature nécrotrophe, donc la réaction hypersensible favorisée par la voie de l'acide salicylique menant à la mort cellulaire ne fait que profiter à ces pathogènes.

Un effet répulsif contre les insectes (Boughton *et al.*, 2006)

Lors d'essai sur la protection de plants de tomate cultivés en serre contre le puceron vert *Myzus persicae*. Boughton *et al.* (2006) ont testé l'harpine (partie 3.1), l'ASM (partie 6.2) ainsi que le méthylejasmonate.

MeJA appliqué au moyen d'une préparation à 5, 7,5 ou 10 mM s'est montré légèrement phytotoxique en limitant la croissance des plantes et en retardant la floraison. Par contre, la croissance de la population de pucerons a été significativement plus lente menant à un nombre limité de pucerons nuisibles. Les analyses ont montré que ce n'était pas dû à la baisse de fécondité des pucerons comme il l'a été observé dans les modalités traitées avec l'ASM.

Ensuite, il a été vérifié que MeJA élicite la formation de polyphénol-oxydases (PPO) qui tiennent quelques rôles clés :

- d'abord, les PPO ont des propriétés rendant la plante indigeste pour les larves de lépidoptères.
- ensuite, les PPO sont retrouvées dans les plants de tomates dans les trichomes glandulaires où elles catalysent l'oxydation de phénols qui produit des sécrétions gluantes. Cette substance agit sur les mandibules des agresseurs, gêne leur mouvement et les ralentit. Elles peuvent même piéger les plus petits insectes. A noter que la présence de trichomes sur la plante permet donc une meilleure protection élicitee par MeJA.

Ces phénomènes montrent bien que la voie de l'acide salicylique, élicitee par ASM ainsi que la voie de l'acide jasmonique élicitee par MeJA, mènent à la construction de réponses différentes. De plus, un traitement simultané d'ASM et de MeJA a permis d'affirmer que ces deux voies n'étaient pas forcément antagonistes.

Un traitement post-récolte moins concluant (Dinh, Joyce *et al.* 2007)

MeJA permet également de supprimer les infections de *Botrytis* sp. sur une gamme de fleurs coupées mais ce genre de traitement tend à augmenter le taux d'abscission des fleurs, phénomène incompatible avec les exigences de la filière fleur coupée. Des chercheurs ont donc travaillé sur la combinaison de MeJA et d'un produit anti-abscission (thiosulfate d'argent ou 1-méthylcyclopropane) pour protéger efficacement les fleurs coupées traitées.

Un traitement au thiosulfate d'argent et au MeJA a permis de réduire la sévérité de la maladie sur les brins issus de la culture en pots. Par contre, ce traitement n'a pas semblé être efficace sur les brins issus des cultures de plein champ. Ces résultats suggèrent une influence prédominante des facteurs « environnement » et « conduite de culture » sur la réponse de défense des plantes.

Pour ce qui est de la tenue des fleurs, le traitement de MeJA couplé au thiosulfate d'argent réduit l'abscission des feuilles en comparaison avec la modalité MeJA seul mais ce taux d'abscission reste supérieur à celui des plantes témoin. Il semble que le thiosulfate d'argent, bloquant la voie de l'éthylène alors que cette voie interagit avec celle de JA, modifie la réponse des plantes face à une pulvérisation de MeJA.

Donc, des traitements combinant MeJA à un agent anti-éthylène ne semblent pas pertinents pour la protection des fleurs coupées.

6.5 Le cis-jasmonate contre les insectes suceurs-piqueurs (Pickett *et al.* 2007)

Le cis-jasmonate induit l'expression de gènes spécifiques, différents de ceux induits par l'acide jasmonique et le méthyl-jasmonate. En fait, le cis-jasmonate n'est pas synthétisé à partir d'acide jasmonique mais remplace plutôt ce deuxième composé en cas d'agression de la part d'insectes suceurs-piqueurs. En effet, ces insectes lors de l'attaque injectent dans la plante une isomérase qui modifie la structure des précurseurs de l'acide jasmonique, les nouveaux précurseurs obtenus permettant la formation de cis-jasmonate.

L'équipe de Pickett a donc effectué des pulvérisations de cis-jasmonate sur un champ de blé. Il s'est avéré qu'une telle opération a provoqué une libération de divers composés volatils et autres métabolites secondaires :

- d'abord, le nombre de pucerons a pu être réduit par l'effet répulsif du 6-méthyl-5-hepten-2-one et d'autres composés. Les essais sur blé d'hiver ont montré qu'une pulvérisation en mai permettait une protection efficace jusque fin juin ;
- ensuite, les insectes auxiliaires tels que les guêpes sont attirés sous l'effet du monoterpène (E)-ocimène ;
- puis, grâce aux composés volatils, le message peut également être véhiculé auprès des plantes voisines ;
- enfin, un effet antibiotique a pu être constaté grâce à la libération d'acides hydroxamiques et acides phénoliques dans l'air mais aussi dans le sol. Les benzoxazinoïdes, faisant partie des acides hydroxamiques, possèdent également un effet allélopathique.

6.6 La coronatine et son homologue synthétique : la coronalone (Schüler *et al.* 2004)

La coronatine est une molécule phytotoxique produite par différentes races de *Pseudomonas syringae*. Cette molécule a la particularité de mimer l'activité biologique de phytohormones comme l'acide jasmonique. Des premiers essais ont montré que la coronatine était active à de très faibles concentrations en comparaison aux phytohormones. Donc, au vu de l'intérêt scientifique et économique de la coronatine, les chercheurs ont recréé une molécule de synthèse proche de celle-ci pouvant être produite à fort rendement : la coronalone. Il s'est avéré que son activité était encore plus importante.

Les différents effets obtenus avec l'application de coronalone sur différentes espèces végétales sont repris dans le tableau de la page suivante.

Tableau 5 : effet de traitements à la coronalone sur différentes espèces végétales (dans Schüler et al. 2004)

Espèce végétale	Matériel végétal utilisé	Molécules produites par l'élicitation	Importance de l'élicitation	Stress « imité »
<i>Glycine max</i>	Suspension de cellules	Flavonoïdes	non précisé	Attaque de Pathogène ou élicitation
		Phytoalexine : Glyceolline	Forte induction dès la dose de 10 µM	
<i>Eschscholzia californica</i>	Suspension de cellules	Alcaloïde : Benzo[c]phénanthridine	Forte induction dès la dose de 5 µM	Elicitation
<i>Phaseolus lunatus</i>	Plante coupée au stade 2 feuilles	Composés volatils dont SA et MeSA	Production augmentée par 9 après 10 h avec 100 µM	Insecte suceur-piqueur
<i>Medicago truncata</i>	non précisé	Composés volatils	résultats détaillés non précisés	Insecte suceur-piqueur
<i>Nicotiana attenuata</i>	Plante entière	Nicotine (alcaloïde)	Production multipliée par 6,6 avec 100 µM	Insecte suceur-piqueur
<i>Solanum lycopersicum</i>	Feuilles	Inhibiteur de protéines n° 2	Pic de production avec 10 µM	Insecte suceur-piqueur
<i>Hordeum vulgare</i>	Feuilles primaires	Protéine induite par le jasmonate	Forte induction à partir de 20 µM	Stress osmotique
<i>Wachendorfia thyrsiflora</i>	Culture de racines	Phénylphénalénone (phytoalexine)	Production multipliée par 8,5 avec 800 µM	Nématode

7. Les éléments minéraux

7.1 Le monosilicate de potassium et le phosphite de potassium

Le monosilicate de potassium permet simplement aux parois cellulaires des plantes de s'épaissir. Le laboratoire BBV et la station Stepp du réseau Astredhor ont étudié cet élément pour la lutte contre la rouille blanche du chrysanthème. Il s'est avéré qu'une dose de 25 ml/l a fourni une efficacité de protection de l'ordre de 50 %.

Quant au phosphite de potassium (formule K_2HPO_3), les essais sur cultures légumières ont montré qu'il est efficace sur les modèles chou-mildiou et laitue-mildiou mais il ne l'est pas contre la bactériose du brocoli causé par *Pseudomonas fluorescens* (Pajot, Aveline et al. 2004).

Il a également été testé par le groupe de travail BBV/Astredhor. Contre la rouille blanche du chrysanthème, un apport à 10 ml/l a diminué le nombre de taches de 30 %. Cependant, l'écart-type mesuré avec ce produit a été fort, il dispose donc d'une efficacité peut-être trop variable.

Ces nutriments sont retrouvés dans diverses préparations commerciales dites biostimulantes. Ces préparations ne sont pas vendues en tant que produit phytopharmaceutiques mais en tant que matières fertilisantes donc non spécifiquement conçues pour protéger les plantes des maladies.

7.2 Le phosétyl-aluminium

■ Présentation et mode d'action

Le phosétyl-Al appartient à la famille des monoéthyl-phosphites métalliques et possède une double activité : directe sur les micro-organismes pathogènes et indirecte en stimulant les défenses natu-

relles des plantes. En fait, le phosétyl-aluminium induit une potentialisation des mécanismes de défense (Bayer Cropscience, 2005).

■ Homologations

27 produits contenant du phosétyl-aluminium sont actuellement homologués en France. La concentration de ces produits commerciaux en phosétyl-Al varie de 30 à 80 % avec ou sans autre matière active. Les homologations portent principalement sur :

- la vigne : protection contre le mildiou, l'excoriose et le black rot ;
- les arbres et arbustes d'ornement ainsi que les pommiers et poiriers contre le feu bactérien, les *Pythium* et *Phytophthora* ;
- les fraises, melons, chicorées et laitues contre le mildiou.

En remarque, lors de tests effectués par des équipes de l'INRA, cette substance n'a pas montré de réels atouts pour une protection vis-à-vis du feu bactérien à la différence de l'ASM alors qu'elle possède une homologation (Brisset, Chartier *et al.* 2004).

L'équipe d'Andreu (2006) a étudié l'effet du phosétyl-aluminium pour la protection des pommes de terre contre *P. infestans* en même temps que BABA (voir partie 6.3)

Les résultats obtenus avec l'un ou l'autre des potentialisateurs ont été équivalents. Ainsi, le phosétyl-aluminium a été appliqué à une dose de 3 kg/ha aux 15^{ème}, 35^{ème}, 55^{ème} et 75^{ème} jour de culture de pommes de terre dans des pots de 7 l. Les résultats ont montré que ce produit a protégé les feuilles d'une éventuelle infection pendant les 60 premiers jours de culture mais seulement sur 2 des 4 variétés à l'étude. Par contre, le taux de protection des tubercules récoltés est très bon. Ce produit pourrait être combiné avec d'autres fongicides pour mieux protéger les feuilles et éventuellement éradiquer ces champignons telluriques en réduisant d'année en année leur nombre.

8. Lutte contre les stress abiotiques

8.1 Lutte contre les stress hydriques

Trouvelot, Dubreuil *et al.* (2006) ont déterminé que la tolérance à un stress hydrique ou salin était due à la fermeture rapide des stomates suite à une accumulation précoce d'acide abscissique. Il est également apparu lors d'expérimentations que des plantes pré-traitées au BABA flétrissaient moins rapidement que des plantes témoin.

Par ailleurs, la spécialité commerciale Megagreen® de Tribo Technologies permet d'améliorer l'état des plantes sous contrainte hydrique. Ce produit est composé essentiellement de calcite (roche sédimentaire issue d'algue) micronisée et élaborée par un procédé breveté.

Il a été vérifié sur plants de vignes développés en conditions contrôlées et mis en situation de stress hydrique, qu'une application de Megagreen® permettait d'améliorer l'activité photosynthétique et l'efficacité de l'utilisation de l'eau pour la photosynthèse via une augmentation de la conductance stomatique. L'effet de ce produit dépend de la concentration en CO₂ ce qui confirme que son mécanisme d'action est essentiellement stomatique. A noter que, sous forte concentration (800 ppm), la photosynthèse est quasi-identique chez tous les plants, stressés ou non.

Les analyses sur suspensions cellulaires ont révélé une activation des voies de signalisation cellulaire : entrée du calcium dans le cytosol, efflux d'anions à travers la membrane plasmique, production de formes actives de l'oxygène. Ainsi, la réponse de la plante qui lui permet une meilleure adaptation à la contrainte hydrique s'appuie sur des modifications des métabolismes primaire et secondaire (Attia, Errakhi *et al.*, 2007).

8.2 Résistance face au gel

Dans le cas de la résistance au gel, les mécanismes de protection font appel à la présence dans la paroi végétale, de cellules d'oligopolymères d'un sucre, le xyloglucane, qui vont accroître la résistance (Fardeau et Jonis, 2004).

Partant de ce principe, un produit à base d'oligosaccharide purifié (l'heptamaloxyloglucane), nommé PEL 101 GV® a été mis au point par la société Elicityl SA. Ce produit a été homologué en tant que produit phytosanitaire sous l'AMM n°2070108 pour protéger les plants de vigne contre les gelées printanières. Il est annoncé comme étant un activateur végétal : la matière active perçue à la surface des feuilles limite l'accumulation de radicaux libres générés lors d'un épisode gélif et provoque l'accumulation dans les feuilles de molécules protectrices telles que le glucose abaissant ainsi le point de congélation des feuilles.

PEL 101 GV® peut être utilisé du stade « bourgeon éclaté » au stade « 6 feuilles étalées ».

Les applications sont préventives et doivent avoir lieu de 12 à 48 heures avant le gel à la dose de 0,5 g/ha, soit 100 l/ha. La persistance d'un traitement est de 4 jours et jusqu'à 4 traitements par saison peuvent être effectués. Ainsi ce produit diminue le taux de nécroses des feuilles de 10 à 70 % à des températures descendant jusqu'à -5 °C. La protection est en fait fonction de la physiologie des plantes et des conditions climatiques exactes et en moyenne elle est chiffrée à 30 / 50 %. Elicityl SA travaille sur l'extension de l'AMM aux productions arboricoles (site Internet www.elicityl.fr).

8.3 Amélioration de la thermotolérance

En réponse à un stress thermique (chaleur), l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique, l'éthylène et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) tiennent chacun un rôle. Larkindale & Huang (2005) ont effectué des essais sur des plantes d'*Agrostis stolonifera* pour définir l'action exacte de chacune de ces molécules dans les mécanismes de protection par rapport à la chaleur. Il s'agissait également de savoir si une application externe de chacun de ces 4 produits permettait aux plantes d'être plus thermotolérantes.

Le stress thermique s'est traduit dans l'essai par un maintien de plantes en pot de 2 ans à des températures supérieures de 15 °C à la normale (35/30 °C au lieu de 20/15 °C) pendant 24 heures pour déterminer l'évolution des composés moléculaires.

Les analyses ont détecté un burst oxydatif 5 minutes après le début du stress puis les molécules de SA ont fait leur apparition 1 heure après. Quant à l'ABA et l'éthylène, leurs concentrations n'ont significativement augmenté que lors des premières heures de la phase de récupération (remise à des températures normales).

Donc, le SA et l'H₂O₂ sont des signaux de stress tandis que l'ABA et l'éthylène sont inclus dans les voies intervenant dans la récupération des plantes suite au stress. En remarque, les protéines synthétisées dans ce cas ne sont pas des protéines PR mais sont dites protéines HS (pour heat shock en anglais) (Van Breusegem *et al.* 2001).

Pour évaluer les effets d'applications exogènes, les plantes ont subi le même stress thermique mais pendant 1 mois, au lieu de 24 h.

Les modalités testées étaient les suivantes (voir le tableau [page 69](#) pour obtenir des concentrations massiques) :

- application d'une solution aqueuse contenant du SA à 10 µM,
- application d'une solution à 0,01% d'éthanol contenant de l'ABA à 5 µM,
- application d'un précurseur d'éthylène (ACC soit acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) à 100 µM,
- application d'H₂O₂ à 9 µM.
- application d'un « pré-stress » par exposition de la plante à 30 °C pendant 24 h avant le stress thermique.

A l'issue de ces essais, les chercheurs ont fait les constats suivants : même si elle a baissé systématiquement, la part de feuilles vertes par plante s'est mieux maintenue sur les plantes traitées et en particulier sur les plantes pré-stressées. Puis, une fois les températures revenues à la normale, les plantes traitées se sont remises normalement alors que les plantes témoin en ont gardé des séquelles. En fait, les traitements ont permis aux plantes de subir moins de pertes en différents composés essentiels à la plante (acides aminés, chlorophylle) et de maintenir un certain taux photosynthétique. Enfin, aucun changement de teneurs en protéines et lipides dans les feuilles n'a été constaté, ces éléments n'interviennent donc pas dans les mécanismes de thermotolérance.

En conclusion, chacune des 4 applications ainsi qu'un stress thermique modéré permettent d'induire une thermotolérance.

8.4 Lutte contre les carences minérales

Le laboratoire Goëmar développe des filtrats d'algues, issus de l'algue *Ascophyllum nodosum*, qui ont des effets activateurs sur la nutrition et la reproduction des plantes. Ceux-ci sont diffusés sous la norme « engrais CE ». Ils ne représentent pas une source nutritive directe mais ils agissent par l'intermédiaire de l'activation des enzymes permettant l'absorption des minéraux du sol.

Les travaux scientifiques ayant pour vocation de mettre en évidence les mécanismes activés par ces produits, ont apporté les réponses suivantes :

- **Nutrition azotée** : l'action des filtrats sur la nutrition azotée des plantes se réalise au travers de l'activation de l'enzyme nitrate-réductase qui a un rôle dans l'absorption de l'azote du sol (Klarzynski, Fablet *et al.* 2006).
- **Chlorophylle** : sous l'action des filtrats d'algues, la teneur en chlorophylle dans les tissus est augmentée (Klarzynski *et al.* 2006).
- **Nutrition phosphatée** : les filtrats d'algues augmentent l'activité des phosphatases des racines. Ces enzymes permettent l'absorption du phosphore en libérant le phosphate fixé à la matière organique du sol, le rendant ainsi disponible pour la plante (Klarzynski *et al.* 2006).
- **Nutrition ferrique** : les plantes (à l'exception des graminées) mettent en place un double mécanisme pour capter le fer du sol. Elles produisent de la ferrique réductase qui transforme le fer Fe^{3+} (inassimilable) en fer ferreux Fe^{2+} (assimilable). Elles disposent également d'un transporteur, appelé IRT, qui se charge du passage du fer Fe^{2+} dans les cellules des racines. Les filtrats d'algues augmentent les activités de la ferrique réductase et du transporteur IRT et limitent donc le phénomène de chlorose ferrique (Euzen *et al.* 2008).
- **Hormones de la floraison** : l'effet des filtrats d'algues sur les polyamines, régulateurs de la floraison, a été mis en évidence sur des cultures pérennes (Gény *et al.* 2007).

Ces spécialités sont distribuées par Goëmar au travers de la marque déposée « Physio Activateur® Technologie », Ces Physio Activateurs® sont positionnés aux stades clés de l'élaboration de la composante de rendement ou de qualité que l'utilisateur souhaite améliorer. Ils induisent une augmentation du potentiel de croissance ou de reproduction de la plante par action sur les étapes clés de son métabolisme primaire. Enfin, ces Physio Activateurs® sont à distinguer des SDN car ils n'ont pas qu'un effet de protection face à un stress. (*cf.* site internet www.goemar.com).

9. L'apparition de résistantes est très improbable

Le processus de défenses naturelles de la plante n'est pas compromis

Le mode d'action spécifique des éliciteurs semble peu exposé à l'apparition de résistance. Leurs effets s'expriment au sein de la plante sur différentes voies métaboliques parallèles, dont au moins les trois connues à ce jour (lignification des parois cellulaires, production de protéines PR et production de phytoalexines). La probabilité d'apparitions simultanées de contournements de ces mécanismes est par conséquent très faible. D'autre part, les récepteurs membranaires pourraient éventuellement subir des altérations ou des modifications génétiques mais ce genre de phénomènes n'allant pas dans l'intérêt des plantes, ils devraient rester exceptionnels (Esnault, Klarzynski *et al.* 2005).

La mutation des pathogènes est improbable

La mutation des pathogènes pour contourner les mécanismes de reconnaissance des plantes est improbable car les SDN agissent comme stimulateurs du processus métabolique au niveau des plantes et non comme inhibiteurs de pathogènes. Ils n'exercent donc pas de pression directe sur la population d'agents microbiens (Esnault, Klarzynski *et al.* 2005).

Cependant, concernant les éliciteurs d'origine fongique ou bactérienne, une crainte serait que les pathogènes modifient leurs facteurs d'avirulence afin de ne pas être reconnu par les récepteurs déclenchant la résistance chez les plantes. Or, il est établi que la plupart de ces facteurs d'avirulence vis-à-vis de plantes résistantes sont également des facteurs de virulence chez des plantes sensibles. Donc, la perte ou la modification du gène codant le facteur d'avirulence s'accompagnerait de la perte de la capacité du pathogène à coloniser des plantes sensibles. Un autre exemple porte sur la flagelline qui représente un élément éliciteur mais qui assure avant tout le mouvement des bactéries, elle leur est par conséquent indispensable et n'est pas vouée à être modifiée (Martinez & Loison, 2006).

10. L'implantation des SDN sur le marché français

10.1 Un contexte réglementaire peu adapté

Les éliciteurs sont soumis à la même réglementation que tous les produits phytosanitaires. En effet, il est admis que « tout produit revendiquant une action de protection des cultures contre tout organisme nuisible (incluant une action de prévention) doit être homologué en tant que produit phytopharmaceutique et suivre la directive 91/414/CEE⁵ qui établit les règles communautaires d'autorisation de mise sur le marché, d'utilisation et de contrôle de ces produits » (Pajot 2005).

La définition exacte d'un produit phytosanitaire, découlant de la directive 91/414 est la suivante : « On entend par produits phytopharmaceutiques, les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur final et qui sont destinées à :

- Protéger les végétaux ou les produits végétaux contre tous les organismes nuisibles ou à prévenir leur action, pour autant que ces substances ou préparations ne soient pas autrement définies ci-après ;
- exercer une action sur les processus vitaux des végétaux, pour autant qu'il ne s'agisse pas de substances nutritives (par exemple, les régulateurs de croissance) ;
- assurer la conservation des produits végétaux, pour autant que ces substances ou produits ne fassent pas l'objet de dispositions particulières du Conseil ou de la Commission concernant les agents conservateurs ;
- détruire les végétaux indésirables ou des parties de végétaux, freiner ou prévenir une croissance indésirable des végétaux.

Or, on dispose de peu d'éliciteurs homologués par cette directive du fait du coût élevé du montage des dossiers d'homologation et des difficultés techniques rencontrées selon la nature du produit (les extraits naturels peuvent être composés de substances actives multiples et non connues rendant ardu le montage d'un dossier).

En 2008, 4 produits sont homologués pour la lutte contre des agents pathogènes : Bion 50 WG®, Stifénia®, Iodus 2® céréales et Iodus 2® cultures spécialisées contre seulement 8 pathogènes sur 6 cultures. De plus, le PEL 101 GV® est homologué pour la vigne contre le gel, stress abiotique. En remarque, le phosétyl-aluminium est homologué depuis de nombreuses années mais, outre son effet SDN, il a d'abord un effet direct sur les pathogènes.

Par ailleurs, les produits fertilisants atypiques, dont certains phytostimulants, peuvent « profiter » de la définition actuelle d'un produit phytosanitaire qui exclut les substances nutritives. En effet, ces produits peuvent posséder à la fois une action sur la croissance des plantes et sur leur résistance face à certaines maladies. Dans ce cas, le fabricant, selon le marché visé (fertilisant ou phytopharmaceutique) et surtout selon ses moyens financiers, aura une stratégie différente. Il est possible que les distributeurs, après homologation de produits en tant que matières fertilisantes, vantent des propriétés élicitrices non garanties pour les utilisateurs.

Dans ce contexte, la CMFSC (Commission des matières fertilisantes et supports de culture) a proposé de définir une catégorie spécifique « biostimulants » suite à des séances de travail tenues de 2002 à 2006. Cette catégorie « biostimulants » pourrait utiliser les principes de réglementation sur les matières fertilisantes avec l'introduction de compléments portant sur une analyse toxicologique et écotoxicologique du produit final (Bargain, 2005). Par exemple, l'Espagne et l'Allemagne ont créé une catégorie « biostimulants » dans leur réglementation.

Donc, pour pallier cette faille, un décret est en cours de préparation afin de distinguer parmi les produits phytopharmaceutiques, une classe « préparations naturelles peu préoccupantes » qui disposera d'une procédure de mise en marché simplifiée (Blogowski, 2008).

Ensuite, il s'agirait dans un futur proche d'établir une harmonisation européenne à ce sujet afin de réduire les distorsions de concurrence entre les états membres.

⁵Directive en ligne : <http://europa.eu/scadplus/leg/fr/lvb/l13002a.htm>

10.2 Les premiers pas des SDN homologués en France

Fort de sa longue expérience, en France comme à l'étranger, dans l'activation de la physiologie des plantes avec sa gamme Physio Activateurs® (voir § 8.4), le laboratoire Goëmar a pu en parallèle développer des SDN destinés à la protection phytosanitaire. Ainsi, deux produits à base de laminaire ont été homologués (cf. § 5.1) :

- Iodus 2® céréales contre la septoriose et l'oïdium du blé tendre ainsi que l'helminthosporiose et l'oïdium de l'orge.
- Iodus 2® cultures spécialisées (CS) contre l'oïdium de la fraise et le feu bactérien du pommier et du poirier.

Les 4 stratégies de positionnement SDN sur lesquelles Goëmar travaille sont les suivantes :

- ➊ Apporter une solution à un problème phytosanitaire pour lequel il n'existe aucun autre moyen de protection efficace ou autorisé. C'est le cas de l'homologation contre le feu bactérien du pommier et du poirier dont dispose Iodus 2® cultures spécialisées.
- ➋ Apporter une solution dans l'optique de réduire la charge de produits chimiques appliqués, pour la préservation de l'environnement et de la santé ou pour la gestion des résistances. Sont concernées, dans ce cadre, les homologations sur blé tendre et orge, ainsi que sur fraise. De plus, sont en projet les homologations sur mildiou de la vigne et sur tavelure secondaire du pommier (attendues pour 2010).
- ➌ Apporter une solution lorsque, concernant les pratiques de traitement, des contraintes réglementaires existent et peuvent pénaliser la protection des cultures (ex. délais avant récolte, délais de retour sur site après traitement parfois contraignants). C'est le cas de l'homologation sur fraise et du projet sur tavelure secondaire du pommier.
- ➍ Apporter une solution venant en complément d'un traitement classique qui ne dispose que d'une efficacité partielle. Dans cette optique, Goëmar a en projet l'homologation sur tavelure primaire du pommier (attendue pour 2010).

La première stratégie s'est révélée payante : l'accueil sur le terrain du produit contre le feu bactérien a été un réel succès, les professionnels de la filière arboricole ont été très réceptifs et se sont avérés satisfaits du produit. En 2008, Goëmar estime avoir couvert la quasi-totalité de la surface concernée (communiqué de presse, Juil. 2008).

La deuxième stratégie s'est avérée fonction de la réceptivité des utilisateurs à des solutions alternatives. Iodus 2® céréales voit son implantation faible par rapport à son potentiel d'utilisation par les céréaliers. Il s'avère que la prescription comme la distribution restent encore peu enclins à promouvoir l'utilisation de produits alternatifs non impactants tant que la législation n'imposera pas de bonnes conduites à ce niveau. En revanche, l'implantation de Iodus 2® CS sur fraisiers en est à ses débuts mais les premiers retours sont positifs : la fraise étant un fruit de consommation directe, les professionnels sont d'autant plus sensibilisés à l'utilisation de produits naturels sans risque de résidus.

Dans le cadre de la 3^{ème} stratégie, la possibilité d'assurer, avec Iodus 2® CS, une protection en période de récolte grâce à l'absence de délai de retour sur site et à un délai avant récolte (DAR) réduit, répond à des attentes fortes de la part des fraisculteurs.

Cependant, comme les cultures céréalières concernent des millions d'hectares et que les cultures de fraises et vergers touchés par le feu bactérien ne portent que sur quelques milliers d'hectares, Iodus 2® céréales reste tout de même, en volume, le produit le plus vendu des deux Iodus, même si pour l'instant, il est largement sous-utilisé par rapport à ses capacités.

En remarque, ces deux produits sont également implantés en Suisse (céréales) et en Belgique (fraise et feu bactérien). Ils sont aussi en cours d'homologation dans d'autres pays (USA, Pologne, Allemagne, Grèce, Espagne...) (Selon les propos de J. Manierski, Chef Produits, Goëmar, déc. 2008).

En ce qui concerne les produits Bion® homologués par Syngenta, les opportunités et difficultés rencontrées sont issues des mêmes raisons :

D'abord, Bion® 50 WG, homologué depuis 2006 contre l'oïdium du blé et la bactériose de la tomate, n'est quasiment plus distribué n'ayant pas trouvé sa place parmi les nombreuses molécules chimiques disponibles contre ces deux maladies. Tout comme Iodus 2® céréales, il souffre du manque d'intérêt des producteurs pour les méthodes alternatives.

Par contre, Bion MX[®], qui contient 4 % d'ASM et 40 % de mefenoxam, a reçu un bon accueil de la part des producteurs de tabac et d'épinards qui faisaient face jusque là à une impasse chimique (Service technique Syngenta, communication personnelle, déc. 2008).

Enfin, l'homologation du Stifénia par la société SOFT qui travaille habituellement sur des molécules de synthèse, représente un pari pour l'avenir. Après avoir acheté le brevet il y a 6 ans, la société possède maintenant une autorisation de mise en marché provisoire concernant l'oïdium de la vigne. Après 3 ans de commercialisation, la satisfaction des utilisateurs est très bonne et en 2008, de 30 à 40 tonnes ont été distribués (le traitement d'un hectare nécessite 1,5 kg de Stifénia). La société distribue également le Stifénia au Luxembourg, en Algérie et en Italie. Elle souhaite maintenant que l'homologation française devienne définitive. A noter que le Stifénia n'est pas encore rentable pour l'entreprise mais que le retour sur investissement devrait avoir lieu d'ici 2 à 3 ans.

Enfin, la société SOFT travaille sur l'utilisation de ce produit dans la lutte contre les nématodes. Le CIRAD a apparemment détecté un effet intéressant sur les plants de banane en serre. Par conséquent, la société souhaiterait mettre en place des partenariats sur ce sujet avec les structures éventuellement intéressées (d'après les propos de M. Delpech, responsable technique du Stifénia, déc. 2008).

En remarque, il est regretté que la France n'ait pas encore distingué parmi les produits phytosanitaires et fertilisants, de catégorie propre aux SDN qui puisse statuer clairement des garanties d'efficacité. En effet, la présence de biostimulants parfois présentés comme SDN fausse le message transmis aux producteurs et décrédibilise l'action des « vrais » SDN (Selon les propos de J. Manierski, Goëmar, Déc. 2008).

11. Conclusion sur les stimulateurs de défenses naturelles

En conclusion, reprenons les différents SDN testés et faisons le point sur l'intérêt potentiel qu'ils dégagent.

D'abord, le chitosan a prouvé que de faibles doses suffisaient pour provoquer une élicitation des plantes mais que son taux de déacétylation était décisif quant à la réponse qu'il engendrait (il semble que ce taux doit être supérieur à 12 %). De plus, son action semble essentiellement foliaire vu que des traitements de graines sont apparus inefficaces. Ce produit a été notamment convaincant sur tomate contre la fusariose et sur vigne contre le botrytis mais dans ce deuxième cas, la modalité d'application ainsi que la variété de vigne sont des critères qui influencent la réponse générée par la plante. Ensuite, l'application de formes avirulentes de pathogènes potentiels s'est montrée encourageante sur culture de colza contre le chancre. La protection offerte est de 1 mois. De tels produits font partie des différentes méthodes de lutte biologique.

Puis, des extraits saccharidiques de paroi de champignon se sont avérés efficaces pour la protection de plantules et de jeunes plants avec de faibles doses. De trop forts apports semblent être phytotoxiques. Les résultats d'expérimentation sur ce type de substance paraissent trop peu nombreux pour évaluer objectivement ces produits.

Les essais avec flagellines et peptides issus de champignons, eux, ont montré que ces éléments pouvaient fournir une très bonne protection mais il s'est avéré que les récepteurs des plantes correspondants ne sont codés que par quelques gènes voire un seul. Dans ce cas de figure en particulier, la reconnaissance pathogène/récepteur semble fragile.

L'harpine, protéine d'origine bactérienne a été homologuée aux Etats-Unis sur différentes cultures, même si cette efficacité s'est révélée être variable. Les tests effectués sur plantes ornementales en France ont détecté une bonne efficacité sur quelques couples pathogène-hôte mais qui est courte dans le temps. Cette molécule ouvre également des perspectives sur la protection des cultures en post-récolte. Cependant, elle semble inefficace pour la maîtrise des populations d'insectes suceurs-piqueurs.

Il a été franchi un grand pas en France avec l'homologation de produits à base de laminarine (issue d'algue) sur blé et vigne, qui peuvent être inclus dans des stratégies de lutte globale. Des essais menés sur les cultures ornementales françaises ont détecté des effets assez positifs si ce n'est très positifs. L'avenir de ce produit semble prometteur.

Quant aux produits d'origine végétale, le premier, Stifénia® à base de graines broyées de fenugrec est également homologué en France pour une utilisation sur vigne tandis que le deuxième, Milsana® à base d'extrait de renouée de Sakhaline est notamment homologué en Allemagne et aux Etats-unis sous l'étiquette de biostimulant. Milsana® possède un effet plus ou moins fort sur tomate et concombre contre le mildiou. Une autre piste d'étude s'est ouverte avec l'extrait de bardane même s'il paraît ne pas posséder une forte persistance.

Enfin, l'utilisation de SDN agissant directement sur les voies de signalisation est apparue très prometteuse, à condition que ce genre de molécule ne soit pas trop onéreux à la fabrication.

Les effets de l'acibenzolar-S-méthyl, ASM, sont concluants sur différentes cultures contre divers pathogènes. Ce produit pourrait faire partie des programmes de traitements dans plusieurs cas. Cet analogue de l'acide salicylique a même montré un effet répulsif contre les insectes alors que beaucoup s'accordent à dire que cet effet est obtenu par les voies de l'acide jasmonique et ses dérivés.

Cependant, quelques phénomènes de phytotoxicité ont été constatés sur tomate ou géranium. Il s'agirait d'affiner les conditions d'application de cette substance (dose, période de traitement) et d'évaluer une éventuelle influence variétale.

L'acide β -amino-butyrique, BABA, a montré un fort potentiel, mais cette substance découverte fortuitement en laboratoire serait chère à produire en quantités importantes.

Le méthyl-jasmonate, comme l'ASM, a souvent prouvé son efficacité, mais qui est malheureusement encore variable selon le type de stress, l'organe touché et la variété végétale concernée. Ce produit a des prédispositions pour la lutte contre la prolifération d'insectes suceurs-piqueurs, tout comme le cis-jasmonate qui permet la libération d'un éventail de composés volatils protégeant les plantes, face aux insectes ravageurs.

Ainsi, des pistes d'études sont envisageables pour la protection des plantes face aux bactéries, champignons et même insectes mais les SDN ne paraissent pas très efficaces face aux problèmes causés par les nématodes. En effet, malgré le pouvoir nématostatique de certaines phytoalexines, ces parasites ont parfois la faculté de bloquer l'expression de certaines protéines PR, limitant ainsi le pouvoir de défense de la plante attaquée. Des essais sur plants de banane menés au CIRAD avec le Stifénia® semblent faire exception.

Par ailleurs, des études en conditions confinées sont une étape préalable indispensable pour définir les conditions d'utilisation de l'éliciteur avant de passer à la phase d'évaluation sur le terrain. Les études en laboratoire permettent également d'étudier les phénomènes biochimiques qui se déroulent dans la plante lors d'une élicitation afin de pouvoir apporter une explication aux phénomènes de résistance observés physiquement.

Les études en laboratoire, nécessaires, n'empêchent pas l'autre nécessité d'effectuer les essais en conditions de production réelles au vu du fort impact de l'environnement sur la réaction des plantes. Les expérimentateurs ont donc la tâche importante d'évaluer les effets environnementaux sur la protection obtenue par le biais des SDN.

Selon E. Pajot (2005b), pour que cette nouvelle méthode de protection des cultures pèse véritablement sur le marché des intrants agricoles, il est important de ne pas sauter d'étapes dans son développement. Les conditions d'utilisation de l'éliciteur doivent être bien définies : physiologie de la plante à protéger, impact éventuel de l'environnement, dose efficace, coût énergétique pour la plante, délai de mise en place de la résistance, etc.

De plus, nous retiendrons que la plupart de ces produits fournissent actuellement une protection partielle et/ou temporaire, suffisante pour réduire les traitements chimiques habituels mais pas assez pour supprimer tout autre traitement.

La production de métabolites secondaires par élicitation

Les métabolites secondaires sont des molécules produites par une plante en dehors des voies métaboliques strictement impliquées dans les processus de croissance. Ces molécules sont très nombreuses (45 000 ont été caractérisées chez les plantes actuellement), certaines sont propres à une espèce végétale donnée et elles possèdent diverses propriétés parfois encore mal connues. Les métabolites secondaires sont classés en trois grandes catégories chimiques :

- Les composés phénoliques, comprenant un groupe phénol (noyau aromatique avec un groupe hydroxyle). Exemple : tannins, flavonoïdes.
- Les terpénoïdes, constitués par la polymérisation d'unités isoprènes à 5 atomes de carbone. Exemple : tanshinone, saponine.
- Les alcaloïdes, contenant des atomes d'azote (hétérocycles azotés). Exemple : morphine, codéine, sanguinarine (Croteau *et al.* 2000).

Lors d'un processus de défense vis-à-vis d'une agression extérieure, la plante active la formation de métabolites secondaires ayant des vocations de protection de la plante et de résistance.

Certains de ces métabolites secondaires représentent des substances actives, exploitées par les industries pour leurs propriétés intéressantes dans le domaine de la chimie, de la pharmacie, des cosmétiques ou de l'alimentaire. Dans les cas où ces composés ne peuvent être synthétisés chimiquement, leur production en grande quantité par du matériel végétal est un axe d'étude opportun.

Outre la recherche et la manipulation d'espèces et de variétés riches en métabolites secondaires intéressants, l'application de stress extérieurs sur les plantes permet parfois l'accumulation de composés actifs dans ces plantes. Donc, la composition chimique des plantes peut être contrôlée par l'amélioration génétique mais aussi par la manipulation délibérée des facteurs environnementaux (Lila, 2006). En travaillant sur ces deux aspects, il devient essentiel de reconnaître la contribution relative du génotype des plantes face à la contribution des éléments composant l'environnement de la plante.

Des stress environnementaux comme des températures basses, blessures, dessiccations, radiations UV élevées ou présence de métaux lourds, peuvent déclencher une cascade de voies biochimiques menant à l'accumulation de métabolites secondaires (Exemple : des anthocyanes sont synthétisés par les feuilles en automne quand les jours raccourcissent et que les températures diminuent. Des flavonoïdes servent d'osmorégulateurs quand la plante est en stress hydrique). Des produits synthétiques et des extraits de levures et de bactéries représentent aussi des éliciteurs potentiels.

Ensuite, comme ces stress provoquent l'activation des salicylates et jasmonates qui sont les agents de signalisation dans la plante, une autre piste d'étude porte sur l'utilisation directe de ces 2 produits ou de leurs analogues pour éliciter la production de métabolites secondaires.

De plus, le fort impact environnemental sur le développement et la croissance des plantes a incité les chercheurs à effectuer leurs expérimentations en conditions contrôlées et notamment sur des cultures de tissus : à l'heure actuelle, la quasi-totalité des recherches est menée sur des cellules végétales en suspension et sur racines villeuses (*ie.* issues de cellules infectées par *Agrobacterium sp.*) autrement appelées « hairy roots ».

Ainsi, les protocoles expérimentaux mis en place dans ce cadre ont un triple objectif de :

- définir les mécanismes exacts menant à la synthèse de ces composés ;
- déterminer des substances capables d'induire la production de métabolites secondaires de manière significativement plus élevée qu'en conditions normales ;
- comprendre quels sont les effets exacts de l'éliciteur employé sur les processus de signalisation et de production. En effet, comme nous l'avons constaté dans le domaine de l'utilisation de SDN, il n'y a pas d'effet universel de la part d'un éliciteur sur différentes plantes. Il s'agit donc une fois encore de déterminer pour chaque espèce les « bons » éliciteurs et la « bonne » dose, nécessaires à l'amélioration du rendement du produit recherché.

Dans les parties qui suivent, chaque catégorie chimique de métabolites secondaires va être présent-

Protocole

Le sulfate de vanadyle a été testé en tant qu'éliciteur abiotique, le vanadium étant un métal lourd rare. Il a été appliqué sur des cellules de 11 jours, à 5 concentrations différentes allant de 6,25 mg/l à 75 mg/l de milieu de culture (Georgiev *et al.* 2006). La teneur en RA a été déterminée par mesures spectrophotométriques sur un filtrat obtenu après plusieurs extractions à l'éthanol.

Ensuite, des concentrations de 25 à 100 μM ⁶ de benzothiadiazole (BTH) et de 12,5 à 150 μM de MeJA dans le milieu de culture ont été testées sur des cellules de 7 jours. (Georgiev *et al.* 2007). Le protocole d'extraction et de détermination suivi a été le même qu'après élicitation au sulfate de vanadyle. Toutes les mesures ont été effectuées dans les 48 heures suivant le traitement. Pour chaque éliciteur testé, deux expérimentations indépendantes répétées 2 fois ont été mises en place.

Résultats

Tableau 6 : effets du sulfate de vanadyle, du BTH et de MeJA sur la production d'acide rosmarinique par des cellules de *Lavandula vera*

Eliciteur	Sulfate de vanadyle	Benzothiadiazole	Méthyl-Jasmonate
Dose optimale apportée	25 mg/l de milieu de culture.	50 μM .	25 à 50 μM .
Impact sur la croissance des cellules	Des doses de 6,25 et 12,5 mg/l ont permis un gain de poids de 2 à 6 % tandis que de fortes doses (50 et 75 mg/l) ont diminué le poids sec de 4 à 12 % par rapport au témoin.	Pas d'impact	Le poids cellulaire a augmenté pour atteindre un pic à E+8 heures après traitement et être significativement plus important par rapport au témoin. Après 48 h, le poids sec diminue pour être significativement plus bas dans le cas où les doses apportées étaient élevées. Ce phénomène est sûrement dû à la mort cellulaire (réaction hypersensible) suite à l'élicitation.
Teneur intracellulaire en RA à la dose optimale	A la dose optimale, la teneur a atteint 3,92 g/l, 12 heures après traitement soit 2,8 fois plus élevé que dans le témoin. La teneur redescend ensuite.	Une élicitation au BTH quelque soit la dose, provoque un pic de production à E+12 ⁷ h. Puis, la teneur en RA diminue fortement à E+48 h.	Des concentrations de 100 à 150 μM induisent une forte synthèse 4 h après traitement mais qui diminue ensuite pour apporter une production finale supérieure de 15 % par rapport au témoin. Les concentrations de 25 et 50 μM provoquent un pic à E+12 heures et permettent une production de RA 2,4 fois plus élevée par rapport au témoin.

En tout cas, ces résultats montrent que le jasmonate de méthyle est un éliciteur efficace pour la biosynthèse d'acide rosmarinique sur des cultures *in vitro* de *Lavandula* et que RA se trouve à des teneurs intéressantes dans les cellules et non dans le milieu de culture.

■ Elicitation de cellules en culture de *Coleus blumei*

L'élicitation de cellules en suspension de *Coleus blumei* par *Pythium aphanidermatum* et par le biais de jasmonate de méthyle a été également testée (Szabo *et al.* 1999). Cet essai, hormis, l'évaluation de la teneur en RA aurait pour but de déterminer le rôle réel des différentes enzymes incluses dans la voie de biosynthèse de RA (*ie.* PAL, TAT, HPPR et RAS, voir paragraphe précédent) en évaluant leur activité.

⁶ Dans ce chapitre, pour convertir les concentrations molaires en concentrations massiques, consulter les indications de la page 77

⁷ Cette notation « E+ x heures » signifie « x heures après l'élicitation ».

Protocole

Les préparations contenant les éliciteurs ont été ajoutées dans le milieu nutritif des cellules, 3 jours après leur mise en culture.

La concentration en MeJA apportée variait entre 0 et 500 μM et la concentration de *P. aphanidermatum* était comprise entre 0 et 0,7 mg éq. glucose par millilitre de suspension. Les résultats ne sont donnés que pour une concentration de MeJA à 100 μg et de *Pythium* à 80 μg éq. glucose / ml culture.

Pour la détermination de la concentration en RA, une CLHP (Chromatographie en phase liquide à haute performance) a été effectuée. Puis, une détection spectrophotométrique a eu lieu à 333 nm.

Résultats

Tableau 7 : effets de MeJA et de *P. aphanidermatum* sur la production d'acide rosmarinique par des cellules de *Coleus blumei*

Eliciteur	MeJA	<i>P. aphanidermatum</i>
Dose testée	concentration de 100 μM	80 μg éq. Glucose/ ml suspension
Impact sur la croissance des cellules	Légère diminution du poids des cellules	Légère diminution du poids des cellules
Teneur intracellulaire en RA à la dose optimale	Après ajout de MeJA à 100 μM , la production de RA ne s'est démarquée du témoin qu'au bout de 16 heures mais elle est restée supérieure au témoin pendant une durée de 5 jours. La plus forte teneur en RA a été enregistrée 56 heures après élicitation avec une part de 3,3 % du poids sec (plus de trois fois plus que dans le témoin).	La quantité de RA a été supérieure au témoin dès 8 h après élicitation. Elle a atteint un pic après 44 h avec une concentration en RA de 2,1 % du poids sec. Des niveaux élevés de RA ont été conservés pendant 5 jours après l'inoculation.

D'abord, une réponse au stress induit un détournement des ressources disponibles pour la biosynthèse de métabolites secondaires (prouvé par la perte en poids et en croissance des cellules élicitées).

Ensuite, il a été constaté que la culture de *C. blumei* répondait plus lentement à une élicitation par le jasmonate de méthyle que par *Pythium* mais l'élicitation au MeJA montre un effet plus conséquent sur la production d'acide rosmarinique.

Enfin, les suspensions de cellules ont également été traitées au jasmonate de méthyle sous forme gazeuse (donc pas de contact direct entre la solution au MeJA et les cellules). Ce système a également eu un effet bénéfique sur la production de RA. Les cellules de *C. blumei* ont été fortement stimulées après 48 h : avec un apport gazeux d'une solution à 2mM de MeJA, la teneur en RA a été triplée en comparaison avec celle de cellules non traitées.

■ Elicitation de chevelus racinaires de la sauge chinoise *Salvia miltiorrhiza*

Les tests sont effectués sur des cultures de chevelus racinaires de *Salvia miltiorrhiza* (Yan *et al.* 2006). Ces chevelus racinaires sont obtenus à partir de tissus infectés par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*. Ce matériel fournit des constituants actifs de manière plus stable et plus efficace qu'une culture classique de cellules en suspension.

Un éliciteur biotique et un éliciteur abiotique ont été mis à l'épreuve :

- le premier est un polysaccharide issu d'un extrait de levure commercial, il est indiqué YE par la suite pour Yeast Extract en anglais,
- l'ion argent Ag^+ est apporté sous forme de thiosulfate d'argent $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en solution.

Ces deux éliciteurs ont été testés pour leur effet sur la production de RA et de composés phénoliques ainsi que sur l'activité de la PAL et de la TAT.

Protocole

D'abord le produit obtenu après diverses manipulations a été analysé par CLHP pour évaluer la teneur en RA. Ensuite, l'analyse des composés phénoliques totaux a eu lieu par la mesure de leur teneur avec le réactif de Folin-Ciocalteu à 765 nm. La teneur en protéines a été mesurée par la méthode de Bradford. L'activité de la PAL a été déterminée à 290 nm et celle de la TAT.

Résultats

YE a bien plus stimulé les voies métaboliques que l'ion argent.

L'activité de la PAL a été significativement diminuée après traitement avec chacun des deux éliciteurs tandis que l'activité de la TAT a été augmentée.

Tableau 8 : élicitation de chevelu racinaire de *Salvia miltiorrhiza* par l'ion argent et par un extrait de levure pour la production d'acide rosmarinique

Eliciteur	YE	Ion argent
Dose optimale apportée dans le mildiou	0,2 g/l	15 µM
Impact sur la croissance (évaluation du poids sec)	Améliorée : après 96 h, le poids des racines traitées était de 7,9 g contre 6,8 g pour le témoin	Non significatif
Activité PAL	Diminuée de 60 %	Diminuée de 50 %
Activité TAT	Augmentée de 100 %	Augmentée de 60 %
Quantité de RA dans le chevelu racinaire après 4 jours	43,8 mg/g de poids sec (soit 1,5 fois plus que dans le témoin)	1,25 fois plus que dans le témoin
Quantité totale de composés phénoliques après 4 jours	20 % supérieure à la quantité contenue dans le témoin	
Quantité de RA après 8 jours	74,1 mg/g poids sec (1,6 fois plus que dans le témoin)	1,4 fois plus que dans le témoin

L'évolution de RA dans le temps suit l'évolution de la teneur en composés phénoliques totaux, ce qui suggère que la plupart des composés phénoliques synthétisés par *Salvia miltiorrhiza* sont des acides phénoliques issus de la voie des phénylpropanoïdes et que RA représente un composé important en pourcentage.

Ensuite, dans ce cas, l'accumulation de RA a pu être corrélée à l'augmentation de l'activité des TAT. Cette expérimentation a révélé une diminution rapide de l'activité de la PAL après traitement qui a précédé l'augmentation de la teneur en acide rosmarinique et en composé phénoliques, résultats en contraste avec des essais précédents qui ont montré que l'activité de la PAL était augmentée. Ce résultat est d'autant plus surprenant au vu de l'intervention habituelle de la PAL après un traitement par éliciteur, une blessure ou une infection dans la biosynthèse de composés phénoliques.

Il existe quand-même des études scientifiques qui ont montré la diminution de l'activité PAL en cas de stress sans pour autant diminuer la quantité de produits phénoliques synthétisés.

Une première hypothèse est que la quantité d'enzymes PAL présente dans le chevelu racinaire de *S. miltiorrhiza* avant élicitation était suffisante pour permettre la biosynthèse de phénols. En effet, leur activité mesurée avant élicitation s'est avérée bien supérieure à l'activité mesurée pour d'autres cultures de cellules. Puis, l'activité enregistrée ayant baissé après l'élicitation, cela met en avant l'hypothèse que des inhibiteurs endogènes ont été mis en place.

L'activité de la PAL n'est donc pas un facteur limitant. En tout cas, cette étude n'a toujours pas permis de définir clairement le rôle des enzymes PAL et TAT ou l'importance de leur teneur dans la biosynthèse de RA.

Une expérimentation précédente menée par une équipe chinoise a déterminé un apport optimal d'extrait de levure à une concentration de 0,1 g/l, ayant pour effet de produire deux fois plus de RA que dans le témoin (production de 25,9 mg/g poids sec au lieu de 12,4 mg/g poids sec) (Chen *et al.*, 2001). Cette élicitation est plus importante que dans l'essai présenté précédemment mais les quantités produites d'acide rosmarinique sont globalement moins élevées.

Test sur chevelu racinaire de basilic, *Ocimum basilicum*

D'après Bais *et al.* (2002), des racines villeuses d'*Ocimum basilicum* contiennent plus de RA (à un taux de 2,98 % du poids frais) que des racines non modifiées (où RA représente 0,98 % du poids frais).

Lors des essais d'élicitation menés par cette équipe, des racines villeuses ont subi des traitements à l'acide salicylique, à l'acide jasmonique, au chitosan et avec des composés de parois cellulaires fongiques. Les mesures ont été effectuées 28 jours après le traitement.

Tableau 9 : synthèse d'acide rosmarinique par élicitation de racines villeuses d'*Ocimum basilicum*

Eliciteur potentiel (concentrations testées)	Acide salicylique (de 50 à 200 µM)	Acide jasmonique (de 100 à 500 µM)	chitosan (de 0,1 à 0,15 % p/v)	Paroi cellulaire de <i>Phytophthora cinnamoni</i> (de 1 à 3 % v/v)	Paroi cellulaire de <i>P. drechsleri</i> (de 1 à 3 % v/v)
Concentration optimale	Aucune	Aucune	Aucune	2 à 2,5 %	2 à 2,5 %
Croissance racinaire par rapport au témoin	Plus faible (noircissement des cellules)	Plus faible	Plus faible	1,87 fois plus élevé (significatif)	1,28 fois plus élevé (significatif)
Concentration en RA par rapport au témoin	Plus faible	Plus faible	Plus faible	Jusqu'à 4 fois plus élevé (concentration de 8 % poids frais) Pic à E+12 jours	Jusqu'à 3 fois plus élevé (6 % poids frais) Pic à E+12 jours

L'acide salicylique, l'acide jasmonique et le chitosan se sont en fait montrés phytotoxiques à toutes les doses et on provoqué la nécrose des tissus et la diminution de la teneur des cellules en RA. Les tests menés avec les extraits de champignon ont été bien plus efficaces avec des augmentations de la teneur en acide rosmarinique significatives.

Essais effectués à l'Iteipmai sur une culture de Mélisse au champ

Rejoignant les protocoles effectués en laboratoire, il est apparu plus judicieux de traiter les plantes par éliciteur juste avant la récolte (de 1 à 4 j) et non quelques semaines avant la récolte.

Parmi les produits testés : chitosan, acide salicylique et laminarine (cette dernière étant testée à travers deux produits commerciaux : Phypé 1007® et Iodus 2®), le produit commercial Iodus 2® a été le seul à éliciter significativement la production de RA et de ses dérivés hydroxycinnamiques. La dose appliquée était de 0,5 l/ha, un peu moins élevée que les doses homologuées sur fraise, pommier ou blé. Cependant, le produit Phypé 1007® composé à partir d'autres adjuvants et pulvérisé à la dose de 1,5 l/ha a fourni les moins bons résultats (teneurs inférieures au témoin mais de manière non significative).

■ Un effet variétal important sur l'intensité de la réponse

Exemple avec le thym

Kwok & Shetty (1996) ont évalué la stimulation de la synthèse de phénols et de RA sur des clones de *Thymus vulgaris* L. *in vitro* suite à une contamination par *Pseudomonas* sp. Trois types de clones ont été sélectionnés selon leur production habituelle de phénols : production faible / moyenne / élevée. D'autre part, 3 espèces de *Pseudomonas* ont été utilisées : espèce mucoïde / partiellement mucoïde / non mucoïde.

La teneur en composés phénoliques totaux a été évaluée par mesure de l'absorbance des solutions obtenues à 725 nm en équivalents acide gallique. La teneur en acide rosmarinique a été évaluée par une analyse UV (absorbance mesurée à 333 nm).

Les tendances observées sont les suivantes :

- La lignée de thym à faible production de phénols n'a pas réagi face aux inoculations des bactéries.
- La lignée de thym « intermédiaire » a été stimulée par l'espèce non mucoïde.

Enfin, la lignée à production élevée en phénols a vu sa synthèse de phénols et de RA augmentée par les espèces mucoïde et partiellement mucoïde mais pas par l'espèce non mucoïde.

Ces résultats soulignent bien que non seulement le niveau d'élicitation peut très bien différer d'un agent éliciteur à un autre et, comme dans ce cas, d'une espèce bactérienne à une autre mais que la réponse est également variable selon la variété végétale concernée et ses prédispositions par rapport à la synthèse de métabolites secondaires intéressants.

Exemple avec des clones de romarin

Des clones de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) ont été développés pour leur forte production de RA. Une expérimentation a été mise en place pour vérifier l'élicitation de diverses lignées de romarin en utilisant *Pseudomonas* espèce F. (Yang *et al.* 1997) et leur capacité à synthétiser RA en retour. Cette sélection avait pour but de détecter quelles étaient les lignées qui présentaient le plus de potentiel de production d'acide rosmarinique pour une culture au champ.

1.2 Production élicitée de flavonoïdes

■ Synthèse de glycosides flavonoïdes

Tumova & Backovska (1999) ont testé une élicitation par le chitosan pour l'obtention de glycosides flavonoïdes. Pour ce faire, une application de chitosan a été effectuée sur des cals d'un mois d'*Ononis arvensis*, de la famille des fabacées. Les cals traités ont ensuite été analysés 1, 2 et 7 jours après l'élicitation.

Protocole testé

Le chitosan est préparé sous différentes formes :

- chitosan en suspension : 3 doses (C1 = 0,09 g/l, C2 = 0,9 g/l et C3 = 9 g/l)
- chitosan en solution titrant à 1% d'acide acétique à 3 concentrations (C1, C2 et C3)

Ensuite, chaque suspension ou solution de chitosan est apportée en plus ou moins grande quantité à la culture de cals : 0,2 ou 0,5 ml.

Concernant la méthode de dosage, l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 420 nm.

Résultats

La concentration C3 s'est révélée être dans la plupart des cas inefficace pour la production de glycosides flavonoïdes. Toutes les autres préparations ont permis d'élever significativement la production en glycosides flavonoïdes.

Le pic de production est atteint dès les 24 h suivant l'élicitation. A E+2 et E+7 jours, la production décroît dans les échantillons élicités tout en restant plus importante que chez les témoins.

La meilleure augmentation de production est obtenue par l'ajout de 0,5 ml d'une solution à 1% d'acide acétique contenant 0,09 g/l de chitosan.

Des résultats similaires ont été obtenus à l'issue de tests sur une culture de racine de *Trigonella foenum-graecum* ; dans ce cas, la concentration de diosgénine a été multipliée par 3 par application de chitosan selon une autre source tchèque (Merkli *et al.* 1997).

■ Biosynthèse de la silymarine

La silymarine est synthétisée par *Silybum marianum*, le chardon-Marie. Dans l'expérimentation de Sánchez-Sampedro *et al.* (2005), des suspensions de cellules d'hypocotyles de jeunes pousses ont été élicitées pour augmenter la teneur en silymarine au sein de ce matériel végétal.

La silymarine du chardon-Marie est composée d'un mélange de flavonolignanes : silychristine, silydianine, silybine et isosilybine. Son action au sein de la plante est inconnue mais la silymarine est utilisée dans le domaine médical contre diverses maladies du foie.

Protocole expérimental

L'analyse des flavonolignanes a eu lieu par CLHP et la détection a été réalisée à 277 nm.

Résultats

Il est apparu dans un premier temps que la silymarine du chardon-Marie était composée à 95 % par la silychristine. Dans le tableau suivant, qui représente l'effet de différents éliciteurs sur la teneur en silymarine, la silymarine est représentée par la somme de silychristine et de silybinines (silybines et isosilybines).

Tableau 10 : élicitation de cellules de *Silybum marianum* pour la synthèse de silymarine

Eliciteur et concentration	Effet sur la teneur en silymarine
Extrait de levure (YE) à 50 µg/ml milieu soit 0,05 g/l	La teneur est supérieure au témoin dès E+12 h. Elle est multipliée par 1,5 entre E+24 et E+48 h puis diminue fortement. Dans le milieu extracellulaire, la teneur en silymarine a été triplée par rapport au témoin.
Acide salicylique à 10 et 100 µM seul	Aucun effet.
Acide salicylique à 10 et 100 µM & extrait de levure	Aucun effet.
MeJA à 10 et 100 µM seul	Efficace à une concentration de 100 µM : de la silymarine a été accumulée à la fois dans les cellules et dans le milieu extracellulaire. L'accumulation a commencé entre 6 et 12 h après élicitation et s'est poursuivie pendant au moins 72 h pour atteindre une teneur 6 fois plus élevée que dans les cellules témoin avant de décroître légèrement. Le phénomène observé est donc important et durable. MeJA est plus efficace que YE seul*.
MeJA et extrait de levure	Les résultats sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec MeJA seul.

* Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'YE induit l'élicitation d'une réponse plus complexe que MeJA qui n'intervient que dans quelques voies de biosynthèse spécifiques. Physiquement, l'élicitation par YE a conduit à un noircissement des cellules.

D'autre part, ces résultats indiquent que l'acide salicylique n'est pas inclus dans les voies de biosynthèse de la silymarine.

Ainsi, les résultats avec le jasmonate de méthyle offrent de belles perspectives pour améliorer la production de silymarine par le chardon à des fins industrielles.

1.3 Synthèse de xanthones et flavones

Des cellules d'*Hypericum perforatum* en suspension ont été élicitées par *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg) et/ou jasmonate de méthyle (MeJA) ou acide salicylique (SA) afin d'augmenter la production de phénols : xanthones ou flavones (Conceição *et al.*, 2005).

Cg est responsable de l'antracnose, causant de nombreuses pertes au sein des plantations d'*Hypericum* sp.

Protocole

Hormis le témoin sans traitement, trois modalités de traitements ont été testées :

- ajout de Cg ou de MeJA (100 µM) ou de SA (25 µM) au 5^{ème} jour de culture ;
- ajout de Cg seul au 6^{ème} jour de culture ;
- ajout de MeJA (100 µM) ou de SA (25 µM) au 5^{ème} jour de culture puis ajout de Cg 24 h après.

Dans les modalités contenant Cg, la concentration finale en Cg contenue dans les flacons était de 0,25 g pds sec/l de milieu de culture.

Résultats

Tableau 11 : production de composés phénoliques par des cellules d'*Hypericum perforatum* selon les différentes modalités appliquées (24 h après élicitation fongique)

Eliciteurs	Production de xanthones	Production de flavonoïdes (flavonols et flavones)
Témoin	3 xanthones synthétisées.	3 flavonols synthétisés.
MeJA seul	Idem témoin.	Synthèse d'une nouvelle classe de flavonoïdes : les flavones.
SA seul	Production significativement augmentée par rapport au témoin.	Production en flavonols réduite.
Cg seul	8 xanthones synthétisées : 3 xanthones habituelles augmentées et de nouveaux composés produits. Teneur totale 7 fois plus importante.	0 flavonoïde synthétisé.
MeJA puis Cg	11 xanthones synthétisées. Teneur totale 12 fois plus grande que le témoin.	Flavonols synthétisés mais de manière significativement plus faible Faible synthèse de flavones.
SA puis Cg	Résultats intermédiaires entre les modalités Cg et MeJA+Cg.	Résultats intermédiaires entre les modalités Cg et MeJA+Cg.

Lors de l'étude sur l'évolution des composés dans le temps :

- la quantité de xanthones pour les modalités incluant le champignon est augmentée dès l'élicitation et elle atteint un palier entre E+24 et E+72 heures. Cette teneur en xanthones rediminue ensuite lentement pour atteindre par exemple avec la modalité « Cg seul » une teneur équivalente au témoin à E+ 7 jours.
- Par contre, la quantité en flavonols pour les trois modalités incluant Cg diminue dès l'élicitation. Plus aucun flavonol n'est produit 72 heures après élicitation, au moment où la production de xanthones est à son paroxysme.
- Enfin, la quantité en flavones, uniquement induite par l'ajout de MeJA, s'accumule pendant les 48 h suivant l'élicitation au MeJA puis rediminue. L'ajout de Cg fait que plus aucune production de flavones n'est détectée à E+72 h.

Les élicitations par SA ou MeJA n'ont en fait pas augmenté la production totale de composés phénoliques. Ces produits ont simplement modifié la nature des différents phénols produits.

Par ailleurs, les xanthones et les flavonols étant synthétisés à partir d'une même batterie de pré-curseurs, cette étude montre que la synthèse de xanthones a été privilégiée au détriment de celle de flavonols. Une autre équipe de chercheurs a pu observer ce phénomène d'augmentation de la teneur en xanthones et de production de nouveaux composés de xanthones sur *Centaurium sp.*, en 1995, suite à l'élicitation provoquée par des champignons.

Enfin, Conceição *et al.* suggèrent que MeJA et SA permettent de potentialiser les cellules, la réponse ensuite obtenue avec Cg ayant été rapide et efficace. Par contre, les voies sollicitées par MeJA et SA doivent être différentes au vu de l'obtention de phénols différents selon la solution apportée.

1.4 Production d'hypericine et hyperforine

L'hypericine appartient à la famille des naphthodianthrones tandis que les hyperforines font partie de la famille des acylphloroglucinols. A l'origine il a été détecté des spécimens de plantes à plus hautes teneurs en hypericines et hyperforines que d'autres, et il s'est avéré que ces plantes étaient plus exposées à la pression exercée par les herbivores, d'où l'hypothèse que ces molécules faisaient partie des mécanismes de défense des plantes (Sirvent & Gibson, 2002).

■ Les voies de synthèse de l'hypericine

A l'occasion d'une expérimentation menée pour établir le lien entre la production d'oxyde nitrique NO (représentant un ROS -reactive oxygen species), d'acide jasmonique (JA) et la synthèse d'hypericine, *Aspergillus niger* a été testé en tant qu'éliciteur sur le millepertuis (*Hypericum perforatum*) (Xu et al. 2005).

Protocole

Une culture de cellules en suspension a été élicitée par l'apport de composés de paroi cellulaire d'*A. niger* à 20 à 100 µg/ml de milieu de culture (soit 0.02 à 0,1 g/l) au 5^{ème} jour de culture. Quant à la méthode de dosage, l'hypericine a été identifiée par chromatographie sur couche mince et CLHP avec détecteur UV.

Résultats

Tableau 12 : élicitation d'*Hypericum perforatum* par *Aspergillus niger* pour la production d'hypericine

Eliciteur	Paroi cellulaire d' <i>Aspergillus niger</i>
Concentration optimale	60 µg/ml soit 0,06 g/l. En remarque, dès la concentration de 80 µg/ml, un effet inhibiteur a lieu
Teneur en NO	Pic 9h après élicitation où la production est multipliée par 5. La teneur diminue ensuite
Teneur en JA	Elle augmente très fortement dès E+6 h pour atteindre un palier jusqu'à E+24 h
Teneur en hypericine	Augmentation au fil du temps. Pic de production constaté 25 j après élicitation avec une teneur multipliée par 4,2

Il a été également vérifié que des sources externes de NO et de JA induisaient la production d'hypericine :

- Une application de NO à 10 mM permet de multiplier la teneur en hypericine par 2, 20 jours après, mais cette réponse dépend de la présence de JA. En effet une application de NO en même temps que des inhibiteurs de la synthèse de JA n'a provoqué aucune augmentation de la teneur en hypericine.
- Une application de JA à 3 µM permet d'obtenir une teneur multipliée par 2,3 et ceci 20 jours après élicitation.

Ces résultats ont permis à l'équipe de recherche de conclure que la biosynthèse d'hypericine est bien subordonnée à l'intervention de NO et de JA. JA agit en fait en aval à NO sur une même voie de signalisation pour la synthèse d'hypericine.

■ Essais sur méristèmes et plantes entières

Des cultures de méristèmes d'*Hypericum perforatum* ont été utilisées pour évaluer l'effet de l'acide salicylique (SA) et du jasmonate de méthyle (MeJA) sur la synthèse d'hypericine et hyperforine.

De plus, *C. gloesporioides* (vecteur de l'antracnose) a été testé en tant qu'éliciteur sur des millepertuis clonés, élevés en serre mais sous conditions de lumière faible afin d'éviter la photodégradation des hypericines. En parallèle, l'effet de feuilles de millepertuis sur le développement des champignons a été évalué (Sirvent & Gibson, 2002).

Protocole

D'abord, deux variétés ont été évaluées : Anthos et New stem. Des mesures en composés actifs ont eu lieu 7 jours après élicitation, d'autres 15 jours après l'élicitation grâce à la méthode de chromatographie en phase liquide. La détection par CLHP de l'hypericine a lieu à 590 nm et celle d'hyperforine à 278 nm.

Les doses testées sont les suivantes :

- 50, 100 ou 200 μM de MeJA ;
- 1, 2,5 et 5 mM d'AS ;
- 1.10^2 , 1.10^4 , 1.10^6 , 1.10^8 spores par ml.

Résultats

Tableau 13 : élicitation des voies de synthèse d'hypericine et d'hyperforine

Eliciteurs potentiels	Acide salicylique (de 1 à 5 mM)	Jasmonate de méthyle (de 50 à 200 μM)	Colletotrichum gloeosporioides (deux isolats testés)
Matériel végétal	Plantules issues de culture de méristèmes.	Plantules issues de culture de méristèmes.	Plantes en pot.
Effet sur le développement	Le poids frais a été plus faible de manière significative mais pas le poids sec.	Le poids frais a été plus faible de manière significative mais pas le poids sec. La dose de 200 μM est légèrement toxique.	
Effet sur la hauteur	Significativement négative.	Significativement négative.	
Teneur en hypericines	Améliorée mais de manière significative seulement à la dose de 5mM.	Augmentée significativement à partir de la dose de 100 μM . La concentration augmente constamment pendant 14 jours et est multipliée par 3,3.	Augmentée à l'issue d'apports de solutions de 1.10^2 et 1.10^4 spores par ml. Des solutions de concentration 1.10^6 et 1.10^8 spores/ml n'ont pas eu d'effet positif.
Teneur en hyperforines	Augmentée significativement dès la dose de 1mM. La concentration augmente constamment pendant 14 jours.	Augmentée légèrement mais de manière non significative sauf à la dose de 200 μM . La concentration augmente constamment pendant 14 jours.	Seule la dose de 1.10^6 spores/ml a eu un effet positif sur la production d'hyperforines. La dose de 1.10^8 est une fois de plus phytotoxique.
Influence sur la variété Anthos	Légère augmentation de la teneur en hypericine. Provoque une baisse de production de pseudohypericines et une hausse de la teneur en protopseudohypericine	Légère augmentation de la teneur en hypericine. Provoque une augmentation non significative de pseudohypericine et n'a pas d'effet sur la production de protopseudohypericine.	
Influence sur la variété New stem	Faible augmentation de la teneur en hypericine. Forte augmentation des concentrations de pseudohypericine et de protopseudohypericine	Augmentation de la teneur en hypericine. Forte augmentation des concentrations de pseudohypericine et de protopseudohypericine	

L'acide salicylique et le jasmonate de méthyle permettent bien d'augmenter la production en hypericine et hyperforine. Il a été constaté une forte augmentation des teneurs en pseudohypericines et en protopseudohypericines, mais de manière différente selon la variété testée.

D'autre part, il a été vérifié que l'hypericine et l'hyperforine sont directement toxiques pour les champignons à la lumière ou dans le noir et que l'hypericine a une activité supérieure à l'hyperforine. Les concentrations qui ont été testées, *ie.* 25 µg/mL de milieu, sont retrouvées dans les plantes cultivées à l'état naturel et ne correspondent pas à des concentrations obtenues suite à des élicitations.

1.5 Elicitation par des extraits de plante riches en phénols

Suite à une étude portant sur la teneur en métabolites secondaires de lignées de thym et d'origan, Perry & Shetty (1999) ont isolé et développé des lignées qui produisent de fortes quantités de phénols (acide rosmarinique et composés phénoliques libres) et qui sont très résistantes à *Pseudomonas* spp. Des extraits de ces plantes ont été testés en tant qu'éliciteurs sur haricots mungo (*Vigna radiata*) germant à l'obscurité (McCue & Shetty 2002). Ces extraits pourraient augmenter la teneur en phénols et antioxydants des graines traitées dans le cadre de la production de germes (marché à forte valeur ajoutée dans certains pays).

Protocole expérimental

Des graines de haricot mungo ont été mises à tremper dans une solution d'eau distillée contenant 1% de chacun des extraits de plante préparés. Puis, ils ont été placés entre deux papiers humides et mis à l'obscurité pendant 1 à 5 jours.

6 extraits de plantes (3 d'origan et 3 de thym) et 5 solvants d'extraction, soit 30 modalités de traitement, ont été évalués selon la production de composés phénoliques qu'ils induisent par rapport au témoin, 3 et 5 jours après le traitement.

L'évaluation de la teneur en composés phénoliques totaux a eu lieu par spectrophométrie à 725 nm après mélange avec réactif de Folin-Ciocalteu.

Résultats

Cet essai a abouti à la sélection de 3 solutions, chacune préparée à partir d'origan.

Il a été ensuite déterminé que ces trois produits avaient la capacité de stimuler la production de composés phénoliques sur les graines de haricot mungo germées dans le noir.

Une application qui pourrait être envisagée si cet effet se confirme est l'amélioration de la teneur en antioxydants des germes destinés à l'alimentation. Ces produits pourraient également permettre de stimuler les défenses naturelles des germes face aux bactéries, problème persistant dans le domaine de la production de germes et jeunes pousses.

1.6 Conclusion sur l'élicitation des voies de synthèse des composés phénoliques

Tableau 14 : synthèse des résultats portant sur l'élicitation des voies de synthèse des composés phénoliques

Eliciteur	Effet	Métabolite recherché
JA	-	Acide rosmarinique
MeJA	++	
SA	-	
Argent	+	
Vanadium	++	
Extrait de levure (YE)	++	
Paroi cellulaire fongique	++	
chitosan	-	
ASM	+	
chitosan	++ à faibles concentrations - à concentration élevée	
SA	0	Silymarine
MeJA	++	
YE	+	
SA puis YE	0	
MeJA puis YE	+++	
SA	+ (nature modifiée)	
MeJA	0	Xanthones
<i>C. gloesporioides</i>	++	
SA puis Cg	+++	
MeJA puis Cg	+++	
SA	-	
MeJA	+ (nature modifiée)	Flavonoïdes
<i>C. gloesporioides</i>	--	
SA puis Cg	-	
MeJA puis Cg	-	
SA	+	
MeJA	++ à faibles concentrations - à concentration élevée	Hypericine
<i>C. gloesporioides</i>	++ à faibles concentrations - à concentration élevée	
Paroi cellulaire fongique	++	
SA	++	Hyperforine
MeJA	+	
<i>C. gloesporioides</i>	+	

Légende : - à -- : effet négatif à très négatif ; 0 : aucun effet constaté ; +, ++, +++ : effet positif moyennement à très élevé.

De plus, il faut noter qu'une élicitation à l'aide des phytohormones SA, JA et son méthyle MeJA va provoquer un déclenchement de certaines voies spécifiques uniquement tandis qu'une élicitation à partir d'un composé issu d'un pathogène provoque une réponse complexe passant par la stimulation de diverses voies métaboliques.

Donc une élicitation à partir de SA, JA ou MeJA n'est pas toujours adaptée mais quand elle l'est, la production de métabolites intéressants est particulièrement importante.

En ce qui concerne l'élicitation par des pathogènes ou par des composés issus de pathogènes, la réponse est très bonne d'une manière générale.

Enfin, une potentialisation grâce à une phytohormone suivie d'une élicitation par le biais d'un pathogène est la configuration la plus intéressante en terme de production de métabolites secondaires.

Par ailleurs, il ne faut pas négliger l'effet variétal sur le type de réponse.

Pour ce qui est des temps de réaction, il semble que les productions d'acide rosmarinique, de silymarine, de xanthones et flavones connaissent un pic de 48 à 72 heures après élicitation. La synthèse d'hypericines semble plus lente et nécessiterait plusieurs jours, de 14 à 27 jours après élicitation, pour atteindre une teneur maximale.

2. Production de composés terpéniques

2.1 Elicitation de la tanshinone, diterpène

Les molécules de tanshinone permettent de réguler la pression sanguine et possèdent notamment des propriétés anti-cancéreuses et d'autres propriétés thérapeutiques.

L'équipe de Ge & Wu (2005) a évalué l'effet du jasmonate de méthyle (MeJA) et de l'acide β -aminobutyrique (BABA) seuls ou précédant une application d'extrait saccharidique (ES) de champignon sur la production de tanshinones par un chevelu racinaire de *Salvia miltiorrhiza*.

Protocole d'essai

Les différentes modalités testées sont les suivantes :

- Ajout de BABA dans le flacon de racines villeuses de 18 jours à 3 différentes doses (0,1, 1 et 2 mM).
- Ajout de MeJA à différentes doses (5, 50 et 200 μ M) dans les mêmes conditions.
- Application de BABA sur des racines de 15 à 18 jours puis élicitation par l'ES à J18. C'est donc un test de potentialisation de 3 à 0 jours avant inoculation.
- Application de MeJA sur des racines de 15 à 18 jours puis élicitation par l'ES à J18.

Résultats

La culture de racines a été examinée 4 jours après la dernière élicitation, soit sur des cellules de 22 jours.

Tableau 15 : production de tanshinones par *Salvia miltiorrhiza* suite à une élicitation et une potentialisation

Eliciteur	BABA seul	MeJA seul	BABA puis ES	MeJA puis ES
Effet sur le poids sec	Plus la dose est élevée, plus la réduction en poids est importante.	Légère augmentation (non significative).	une teneur en BABA à 2µM a un effet négatif sur le poids sec.	Légère augmentation (non significative).
Effet sur la teneur en tanshinones	Augmentation : Une dose de 2mM a permis la synthèse de 4,5 fois plus de tanshinone que dans le témoin (soit 0,11 % au lieu de 0,025 % du poids sec)	Augmentation.	Augmentation plus importante que BABA seul avec des doses moins élevées : Une dose de 1 mM a multiplié la teneur par 2,26 par rapport à BABA seul. (teneur finale : 0,23% pds sec) Plus BABA est apporté tôt avant inoculation, meilleure est la réponse. BABA en J15 puis ES en J18 a permis d'obtenir les meilleurs rendements.	Des doses de 5 et 50 µM ont permis d'augmenter la teneur de 30 à 40 %. Une dose de 200µM a moins d'effet sur la teneur. L'intérêt de MeJA n'est justifié que lorsque MeJA est appliqué au moins 3 jours avant l'élicitation par ES.

Lors de la potentialisation par BABA, il a été remarqué que plus la dose apportée est forte, plus la teneur en tanshinones augmente et plus le poids sec diminue.

Cette expérimentation a permis de mettre en avant la nécessité d'un temps de repos entre l'application d'un potentialisateur et l'élicitation (2 à 3 jours selon le potentialisateur dans les conditions d'expérimentation).

Les essais de Chen *et al.* (2001) sur le même matériel végétal ont montré que l'ES avait la capacité de multiplier la synthèse de tanshinone par 100 (teneur en tanshinone de 0,096 % de poids sec dans les racines élicitées contre 0,001 % dans les racines témoin) et d'augmenter la croissance des racines mais le pic de production n'a été observé que 7 jours après l'élicitation.

En conclusion, BABA est donc un bon potentialisateur pour la production de métabolites secondaires. Il en est de même avec le jasmonate de méthyle mais avec des doses qui ne doivent pas être trop élevées.

Par ailleurs, une autre expérimentation a été réalisée pour l'évaluation de l'effet l'acide salicylique seul ou combiné avec un extrait de levure sur la synthèse de tanshinone et il est apparu que SA seul n'induisait aucune stimulation de la synthèse de ce terpène. Par contre, SA appliqué quelques jours avant un extrait de levure permet bien d'éliciter la voie de biosynthèse des tanshinones (Ge & Wu 2005).

2.2 Production d'un triterpénoïde à des fins phytosanitaires : l'azadirachtine

Des cellules en suspension d'*Azadirachta indica* (margousier ou neem en anglais) ont été cultivées afin d'évaluer l'effet de 5 éliciteurs pour la production d'azadirachtine, principal métabolite secondaire de l'arbre de neem, qui possède des propriétés insecticides (Prakash & Srivastava, 2008). Les mesures ont été effectuées 12 jours après élicitation.

Tableau 16 : élicitation des voies de synthèse de l'azadirachtine chez *Azadirachta indica*

Eliciteurs et concentrations testés	Effet sur le poids sec	Effet sur la production d'azadirachtine
Acide Jasmonique de 10 à 100 mg/l	Augmentation significative.	Plus fortes augmentations obtenues aux plus petites concentrations. La teneur est au moins multipliée par deux.
MeJA de 12 à 120 mg/l	Baisse significative.	Plus faible augmentation obtenue avec la plus grande dose.
Acide salicylique de 14 à 70 mg/l	Baisse suite à l'apport d'une faible concentration.	Augmentation significative à toutes les concentrations. Mais plus la concentration est élevée, plus la teneur augmente. Teneur 2,7 fois plus élevée à la dose de 70 mg/l.
Chitosan de 50 à 500 mg/l	Diminution légère aux concentrations élevées.	Les meilleurs résultats sont obtenus avec les plus faibles doses. Production multipliée par 2,8 à une dose de 20 mg/l.
Extrait de levure de 0,01 à 0,05 g/l	Non significatif.	Multiplication de la teneur par 2, constatée seulement à la dose de 0,05 g/l.
Saccharide issu d'extrait de levure de 0,5 à 3% v/v	Non significatif.	Augmentation de la teneur de 25 % avec des doses supérieures à 0,5 % v/v.

Les meilleurs éliciteurs (acide salicylique, acide jasmonique et chitosan) permettent de multiplier les teneurs en azadirachtine par trois. Cependant, les résultats indiquent que les plus fortes élicitations avec JA et chitosan sont obtenues par l'application de très faibles doses. Il serait peut-être judicieux de baisser ces doses à l'avenir. A l'inverse, il s'agirait d'augmenter les doses appliquées en SA au vu des résultats.

Une étape suivante de l'expérimentation a consisté à éliciter les cellules de neem avec un apport simultané des 3 meilleurs éliciteurs afin de juger de l'effet de leur combinaison. Des premiers essais avec différentes doses ont eu lieu afin d'établir une équation du 3^{ème} degré intégrant les trois éliciteurs par le biais de la méthodologie statistique des surfaces de réponse. Cette équation, dont la fiabilité a été vérifiée, a permis de définir trois concentrations optimales à appliquer simultanément à savoir : 137 mg/l de SA, 2,9 mg/l de JA et 16,5 mg/l de chitosan.

Afin de valider les hypothèses établies par le logiciel, des prélèvements de cellules traitées aux doses indiquées ci-dessus ont eu lieu entre 24 et 96 h suivant l'élicitation.

Dans cette configuration, le pic de production a eu lieu à E+ 48 h et a atteint la valeur de 15,9 mg d'azadirachtine / g sec. Cette valeur est moins élevée que celle prédite par le modèle (18,4 mg/g sec) mais elle représente une validité de 87 % du modèle établi et est largement supérieure à la teneur du témoin qui est de 3,2 mg/g.

2.3 Synthèse de saponines terpéniques cycliques

L'expérimentation en question a été menée sur des racines villeuses de *Panax ginseng* de 21 jours afin d'éliciter la biosynthèse de saponines. L'élicitation a été provoquée par des substances de diverses natures dont l'acide salicylique, des métaux lourds et par l'application d'une bactérie, *Agroacterium rhizogenes* qui est le vecteur de développement des racines villeuses (Jeong *et al.*, 2005 et 2006).

Les résultats relevés 3 jours après chaque traitement sont synthétisés dans le tableau suivant.

Tableau 17 : élicitation de racines villeses de *Panax ginseng* pour la production de saponine

Eliciteurs (test 2005)	Acide salicylique	Acide acétyl-salicylique	Extrait de levure	Bactérie
Concentrations étudiées	De 0,1 à 10 mM.	De 0,01 à 1 mM.	De 0,02 à 0,2 g/l.	De 1 à 10 mg/l.
Dose optimale	0,5 mM et en dessous.	0,5 mM et en dessous.	0,1 g/l.	4 mg/l.
Impact sur la croissance	Fort effet négatif sur le poids frais et sec.	Fort effet négatif sur le poids frais et sec.	Fort effet négatif sur le poids frais et sec.	Légère diminution de la croissance.
Impact sur la production de saponines	Multiplication de la production par 1,25.	Augmentation légère de production jusqu'à 0,5 mM, puis diminution légère à 1 mM.	Teneur multipliée par 1,17.	Teneur multipliée par 1,23.

Eliciteurs (tests 2006)	Acide Tannique	Sélénium	Nickel (NiSO ₄)	Chlorure de sodium (NaCl)
Concentrations étudiées	De 0,1 à 10 mM.	De 0, 1 à 0,5 mM.	De 1 à 50 µM.	De 0,01 à 0,3 % p/v
Dose optimale	Aucune.	0,1 mM.	20 µM.	0,1%.
Impact sur la croissance	Fort effet négatif sur la croissance.	Fort effet négatif sur le poids frais et sec.	Pas d'effet sur la croissance.	Croissance égale au témoin (sauf à la dose de 0,3 % où elle est inhibée).
Teneur en saponine (mg/g poids sec)	Pas d'effet sur la teneur.	multipliée par 1,31.	multipliée par 1,2.	Teneur multipliée par 1,15.
Productivité en saponine (mg/l surnageant)		multipliée par 1,33.	multipliée par 1,23.	multipliée par 1,13.

En remarque, l'élicitation par le biais de bactéries s'est avérée d'autant plus intéressante que, comparée à une élicitation par des extraits de levure, les temps de préparation de la solution sont moindres, le coût est moins élevé et la solution est prête plus rapidement. Les élicitations par le nickel et par le sélénium possèdent les mêmes atouts et permettent d'obtenir de bons rendements.

Précédemment, une équipe chinoise a travaillé sur l'élicitation de cellules de ginseng par des extraits de paroi de *Colletotrichum lagerarium* nommés « Cle » afin d'étudier les mécanismes élicités. A cette occasion, la teneur en saponine a été évaluée ; une dose de 50 µg Cle/ml de culture a permis d'obtenir une teneur finale de 5,5 % poids / poids sec cellule au lieu de 3,4 % après 72 heures, soit une concentration multipliée par 1,7 (Hu *et al.* 2003).

2.4 Elicitation de la voie des diacétylènes et de la synthèse d'éthers spiroketal-enol

La grande camomille *Tanacetum parthenium* a la capacité de synthétiser deux coumarines (composés phénoliques) et quatre éthers spiroketal-enol, diacétylènes qui possèderaient diverses propriétés thérapeutiques et insecticides.

Ces 4 éthers sont :

- (1) Trans-C13-spiroketal enol éther
- (2) Cis-C13-spiroketal enol éther époxyde
- (3) Cis-C13-spiroketal enol éther
- (4) Trans-C14- spiroketal enol éther

Matériel et méthodes

Des tests d'élicitation sur racines villeuses ont eu lieu avec un extrait de levure, du nitrate d'argent mais aussi des glycoprotéines issues d'une microculture d'algue de *Scenedesmus obliquus* (MGPS) (Stojakowska *et al.* 2008). Le traitement a eu lieu sur des cultures de 10 jours et les analyses ont eu lieu à E+48 h et E+96 h par réalisation de chromatographie. Les pics des composés (1), (3) et (4) ont été mesurés à 315 nm et celui du composé (2) à 224 nm.

Résultats

Tableau 18 : élicitation des voies de synthèse d'éthers spiroketal-enol chez *Tanacetum* sp.

Eliciteurs	YE	AgNO ₃	MGPS
Concentration finale dans le milieu de culture	0,08 % p/v (soit 0,8 g/L).	0,1 mM.	0,02 % p/v soit 0,2 g/L.
Effet sur la croissance des cellules	Augmentation de la croissance des cellules à E+48 h puis retour à la normale à E+96 h.	Diminution de la croissance entre 48 et 96 h (20 à 30 % en moins en poids sec).	Pas d'effet.
Effet sur le composé (2) (cis-C13-spiroketal enol ether epoxide)	Teneur multipliée par 3 à E+96 h.	Teneur multipliée par 3 tout au long de l'élicitation.	Teneur multipliée par 2,4 à E+48 h qui descend très légèrement après 96 h.
Effet sur les 3 autres composés (1), (3) et (4)	Teneur significativement réduite.	Teneur significative-ment réduite.	Teneur significativement réduite.

Ces essais ont montré que les éliciteurs avaient une influence uniforme sur le mode de production de ces 4 diacétylènes : augmentation de la production de (2) et baisse significative de la teneur en (1), (3) et (4).

Des essais précédents ont montré qu'un traitement de racines villeuses de grande camomille au MeJA permettait de multiplier par 2 la teneur de chacun des 4 éthers. Par contre, un traitement à l'acide salicylique a également diminué la production de (1), (3) et (4), et augmenté celle de (2).

Une hypothèse est que le diacétylène (2) a un rôle principal de défense de la plante et qu'il doit donc disposer de propriétés antimicrobiennes.

2.5 Conclusion sur l'élicitation des voies des terpènes

Tableau 19 : synthèse des résultats portant sur l'élicitation des voies de synthèse des composés terpéniques

Eliciteur	Effet	Métabolite visé
SA	0	Tanshinone
MeJA	+	
BABA	++	
SA puis ES (extrait saccharidique)	++	
MeJA puis ES	++	
BABA puis ES	+++	
SA	++	Azadirachtine
JA (aux faibles doses)	++	
MeJA	+	
YE	+	
chitosan (aux faibles doses)	++	
SA+JA+chitosan	+++	Saponines terpéniques
SA	++	
Acide acétylsalicylique	-	
YE	+	
Bactérie	++	
Chlorure de sodium	++	
Nickel	++	
Sélénium	++	
MeJA	++	
YE	++ (Un composé élicité	Ethers spiroketal-énol
Glycoprotéine d'algues	++ aux détriments	
Nitrate d'argent	++ des autres)	

Légende : - : effet négatif ; 0 : aucun effet constaté ; +, ++, +++ : effet positif moyennement à très important

Outre ces résultats, il a été montré lors d'une expérimentation que l'application d'une combinaison de plusieurs éliciteurs pouvait être très bénéfique. De plus amples recherches à ce niveau pourraient se montrer fort intéressantes.

Parmi ces expérimentations, ont eu lieu des essais avec des métaux lourds (argent, nickel et vanadium) qui apparaissent comme un moyen d'élicitation envisageable.

Enfin, une fois de plus, il a été prouvé qu'une potentialisation apportait un avantage non négligeable sur la production de métabolites secondaires. A noter qu'une période de latence entre l'application du potentialisateur puis de l'éliciteur doit être suffisamment longue.

Il semble que les voies de synthèse des tanshinones, saponines et ethers spiroketal-énol soient à leur maximum de production 4 jours après l'application d'éliciteurs. Pour le cas de l'azadirachtine, les mesures ont été effectuées 12 jours après élicitation et les teneurs obtenues ont été très élevées.

3. Synthèse d'alcaloïdes

3.1 Caractérisation de la voie de biosynthèse des alcaloïdes

Facchini a étudié en 1998 la relation entre le métabolisme de la tyramine et la biosynthèse d'alcaloïdes et d'amides d'acide hydroxycinnamique (polyphénols) chez le pavot somnifère, *Papaver Somniferum*. L'élicitation des cellules de pavot conduit à une augmentation de la synthèse de dopamine et de tyramine, et ceci conduit à une augmentation de la production de sanguinarine (alcaloïde benzylisoquinoline) et d'amides. Il existe en effet une corrélation temporelle entre la biosynthèse de sanguinarine et celle d'amides, l'accumulation de la TYDC (tyrosine/dopa decarboxylase) et de la BBE (berberine bridge enzyme) et l'induction de la THT (tyramine hydroxycinnamoyl transferase) comme le montre la figure 5.

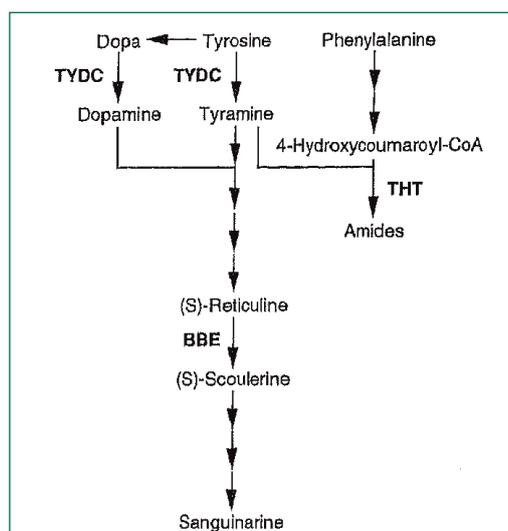


Figure 5 : Représentation schématique illustrant les sites d'action des enzymes TYDC et BBE dans les voies de biosynthèse de la sanguinarine et d'amides d'acides hydroxycinnamiques chez *Papaver somniferum*.
Source : Facchini, 1998

3.2 Elicitation de cellules d'opium pour la production de sanguinarine

Des cultures de cellules en suspension de *Papaver somniferum* de 4 jours ont été élicitées par *Botrytis sp.*, *Fusarium oxysporum* et *Pythium aphanidermatum* (Facchini *et al.* 1996). En plus de déterminer l'effet sur la production de sanguinarine, les effets sur l'activité enzymatique de la TYDC travaillant en amont sur la voie de biosynthèse ont été également évalués.

Tableau 20 : élicitation de *Papaver somniferum* par des champignons pour la production de sanguinarine

Eliciteurs	<i>Botrytis sp</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Concentrations testées	De 0,01 à 1 ml de préparation / 50 ml de culture.	De 0,01 à 1 ml de préparation / 50 ml de culture.	De 0,01 à 1 ml de préparation / 50 ml de culture.
Concentration optimale	1 ml / 50 ml de culture.	1 ml / 50 ml de culture.	1 ml / 50 ml de culture.
Activité TYDC	Multipliée par 10 à E+2 h Multipliée par 5 à E+80 h (en pente).	Seulement multipliée par 2 au bout de 20 h.	Multipliée par 10 à E+10 h puis décroissante.
Teneur en sanguinarine	Augmentation 10 h après élicitation. A E+80 h, la teneur est multipliée par 100	Augmentation moins élevée.	non précisé.

Ces essais montrent bien qu'une augmentation de l'activité enzymatique des TYDC induit l'accumulation de sanguinarine dans les cellules.

Cet essai met en valeur le fait que l'importance de l'élicitation dépend bien de l'éliciteur utilisé.

4. Elicitations *in vivo*

4.1 Application de chitosan sur une culture de basilic en pot

Une des seules expérimentations conduites au champ a porté sur l'application de chitosan sur une culture de basilic en pot (*Ocimum basilicum* L.) afin d'évaluer ses effets sur les propriétés biologiques et biochimiques de ce végétal (Kim, Chen *et al.* 2005).

Protocole expérimental

Des graines de basilic ont été achetées puis trempées dans des solutions à diverses concentrations en chitosan (0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % et 1 % dissous dans une solution de 0,5 % d'acide lactique) pendant 30 minutes. Les basilics ont ensuite été cultivés en plaque sous serre, en conditions normales d'irrigation et de fertilisation. En cours de culture, ils ont été transplantés en pots de 0,4 l et, avant rempotage, les racines ont été à nouveau trempées dans les différentes solutions pendant 30 minutes.

Pour les analyses qui ont suivi, les composés phénoliques ont été séparés et identifiés à l'aide d'une chromatographie liquide à haute performance tandis que les composés terpéniques ont été identifiés à l'aide d'une colonne capillaire et spectrométrie de masse. Tous les composés volatils ont été mesurés par GC/MS. Il faut savoir que, parmi les métabolites secondaires présents dans le basilic, cinq composés principaux sont retrouvés : l'eugénol, le méthyl-eugénol, le L-linalol le 1,8-cinéole et la bergamotène.

L'activité antioxydante des composés phénoliques a été mesurée par l'activité d'élimination des radicaux libres de DPPH (2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl).

Résultats obtenus

Tableau 21 : synthèse de divers métabolites secondaires par des plantes d'*Ocimum basilicum* à la suite d'une élicitation par le chitosan

Critères évalués	Concentration optimale en chitosan selon le critère évalué	Gains obtenus par rapport au témoin
Hauteur	0,1 %.	+17 %.
Poids frais	0,1 %.	+12 %.
Teneur en composés phénoliques	Palier atteint dès la dose de 0,1 %.	Teneur multipliée par 1,6.
Activité de la PAL (enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes)	Pic à la dose de 0,5 %/	Activité 32 fois supérieure à celle des témoins. (à une dose de 1 %, cette activité n'est plus que 7 fois supérieure).
Teneur en acide rosmarinique	Palier atteint dès la dose de 0,1 %.	Teneur multipliée par 2,6.
Teneur en eugénol	Environ 0,6 %.	Teneur doublée pour une concentration de 0,5 %.
Méthyl-eugénol (cancérogène ?)	Ce composé est soupçonné d'être cancérigène. Sa teneur est stimulée par le chitosan mais une dose de 1% fait décroître sa teneur.	
Activité antioxydante des comp phénoliques	Palier atteint dès la dose de 0,1 %.	Activité multipliée par 3,5.
Teneur en terpènes	Pic à 0,4 % (estimé).	Teneur augmentée de 45 %.
Teneur en L-linalol	Environ 0,1 %.	Teneur doublée pour une concentration de 0,5 %.

Un gain en hauteur est permis avec l'apport de doses modérées en chitosan (concentration de 0,05 à 0,5 %). Après, la substance étant collante, les expérimentateurs ont émis la possibilité que l'enrobage des graines et des racines ait empêché une bonne absorption de l'eau et des différents éléments minéraux.

La teneur en phénols, en RA et leur activité antioxydante évolue de la même manière selon la dose en chitosan apportée : elles suivent une augmentation exponentielle jusqu'à atteindre un palier dès la concentration de 0,1 % en chitosan dans le milieu. Des concentrations supérieures à 0,1 % ne permettent pas l'augmentation des teneurs en phénols ou en RA ni celle de leur activité antioxydante.

D'ailleurs, l'activité antioxydante a été principalement due à la présence d'acide rosmarinique d'après les mesures de l'activité éliminatrice des radicaux libres de DPPH.

Ces résultats montrent que le chitosan peut très bien induire une élicitation sans le moindre stress extérieur. Le chitosan peut aussi provoquer une augmentation de la production de métabolites secondaires et ce, avec efficacité et sans la moindre modification génétique.

4.2 Stress abiotique sur matricaire en conditions contrôlées

Matricaria chamomilla contient divers métabolites secondaires dont les coumarines qui constituent des substances actives aux propriétés pharmacologiques. L'équipe d'Eliasova (2004) a étudié l'effet d'une application de chlorure de cuivre (CuCl_2) sur la formation des principales coumarines et d'un terpène au sein de cette plante.

Matériel et méthodes

Les essais sont menés sur des plantes de 12 semaines en conditions de laboratoire. Les extrémités en croissance des plantes ont été pulvérisées avec une solution aqueuse de CuCl_2 à 2 %. Ensuite, les analyses ont été menées sur les plantes, de 6 à 54 h après élicitation : la teneur en métabolites secondaires a été estimée par CLHP.

Résultats

Malgré les effets néfastes du cuivre qui a provoqué dans l'essai l'enroulement de feuilles et l'apparition de taches nécrotiques, les plantes se sont assez bien maintenues.

Par ailleurs, la teneur en différentes coumarines a changé considérablement au sein des plantes tétraploïdes après l'élicitation :

- Dès 6 h après traitement, la teneur en herniarine et umbelliférone, principaux composés phénoliques, a fortement augmenté.
- La teneur en herniarine a connu un pic à E+18 h où sa valeur a été multipliée par 4 par rapport aux plantes témoin. Puis, elle est redevenue « normale » à E+54 h.
- La teneur en umbelliférone, elle, a été à son maximum à E+42 h avec une valeur 9 fois supérieure à la teneur des plantes témoin.
- Pour ce qui est de la teneur en ene-yne-dicycloether, principal polyacétylène de la plante, une baisse significative par rapport au témoin a été constatée à E+18 h.

La réponse des variétés diploïdes a été similaire concernant les évolutions des quantités d'herniarine et de dicycloether. La quantité en umbelliférone, elle, a été dans cette situation multipliée par 20.

Ces résultats montrent que les coumarines, herniarine et umbelliférone, sont des phytoalexines, fortement sensibles à des élicitations. Ce n'est cependant pas le cas du polyacétylène étudié dans cette expérimentation.

En outre, la polyploïdie est considérée comme un moyen d'augmenter le potentiel de production des plantes mais les études portant sur les teneurs en métabolites secondaires, celle-ci incluse, apportent des résultats ambigus.

5. Conclusion sur l'élicitation des voies métaboliques secondaires

Cet axe de recherche est vaste et complexe car les chercheurs se trouvent face à un nombre assez élevé d'éliciteurs dont le potentiel doit être évalué pour un grand nombre de métabolites recherchés. Cette complexité est accentuée par le fait que la sensibilité à tel ou tel éliciteur de la part des plantes varie selon l'espèce et même selon la variété.

L'utilisation de phytohormones (acide salicylique et acide jasmonique en particulier) en tant qu'éliciteurs semble provoquer une réaction soit nulle, soit excellente selon le métabolite ou la plante étudiée.

Quant aux applications d'éliciteurs issus de pathogène ; elles permettent souvent d'obtenir une réponse de la part de la plante mais qui se trouve variable encore une fois selon le métabolite visé et l'espèce végétale.

Ensuite, la combinaison d'une phytohormone appliquée antérieurement à un éliciteur biotique apparaît comme étant fortement élicitrice, cette piste de travail est donc intéressante.

Puis, les temps de réaction au sein des plantes sont généralement très rapides et les teneurs maximales en métabolites secondaires sont souvent obtenues au bout de quelques heures, de 24 à 72 heures.

Enfin, ces résultats ont été principalement acquis suite à des essais menés *in vitro* mais les premiers essais effectués sur plantes entières ont fourni des données encourageantes.

Liste des abréviations

ABA	acide abscissique
AFPP	association française de protection des plantes
AMM	autorisation de mise en marché
ASM	acibenzolar-S-méthyl
BABA	acide β-aminobutyrique
BBE	berberine bridge enzyme, qui intervient dans la voie de biosynthèse d'alcaloïdes
BTH	benzothiadiazole
Ca⁺⁺	ion calcium
Cg	champignon <i>Colletotrichum gloesporioides</i>
Cl⁻	ion chlorure
CLHP	chromatographie en phase liquide haute performance
DPPH	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
ES	extrait saccharidique de champignon
FORL	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>
GC/MS	chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse
H⁺	ion hydrogène
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HPPR	hydroxyphényl pyruvate réductase, intervenant dans la voie de synthèse de dérivés de tyrosine
HRPG	glycoprotéine riche en hydroxyproline
INA	acide 2,6-dichloroisonicotinique
JA	acide jasmonique
K⁺	ion potassium
K₂HPO₃	phosphite de potassium
LOX	lipoxygénase, enzyme qui permet la synthèse de précurseurs de JA
MeJA	jasmonate de méthyle
MGPS	glycoprotéine issue de l'algue <i>Scenedesmus obliquus</i>
NADPH oxydase	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NO	oxyde nitrique ou monoxyde d'azote
PAL	phénylalanine ammonia-lyase, enzyme qui intervient dans la voie de synthèse des composés phénoliques
PAMP	pathogen-associated molecular pattern. En français, motif moléculaire propre à un pathogène
PPO	polyphénol-oxydase
Protéines PR	PR signifie « pathogenesis-related » en anglais
RA	acide rosmarinique
RAS	rosmarinic acid-synthase
RSA	résistance systémique acquise
ROS	reactive oxygen species
SA	acide salicylique
TAT	tyrosine amino-transferase, autre enzyme qui intervient dans la voie de synthèse de dérivés de tyrosine
THT	tyramine hydroxycinnamoyl transferase
TYDC	tyrosine/dopa décarboxylase
YE	extrait de levure (yeast extract en anglais)

Liste des tableaux et figures

Figure 1	Réseau de transduction d'un signal d'élicitation (Zhao <i>et al.</i> 2005)	15
Figure 2	Schéma simplifié des principales réactions de défenses structurales et biochimiques élaborées par la plante en réponse à l'agression	18
Figure 3	Voies synthétisant l'acide rosmarinique (Yan <i>et al.</i> 2006)	52
Figure 4	La voie du pentose phosphate liée à la proline régule celle des phénylpropanoïdes et stimule la production d'acide rosmarinique (McCue and Shetty, 2002)	53
Figure 5	Représentation schématique illustrant les sites d'action des enzymes TYDC et BBE dans les voies de biosynthèse de la sanguinarine et d'amides d'acides hydroxycinnamiques chez <i>Papaver somniferum</i> .	64
Tableau 1	Étude sur les effets de la laminarine sur diverses cultures ornementales	34
Tableau 2	Effet de l'ASM sur la protection de diverses plantes ornementales	37
Tableau 3	Exemples de plantes exprimant une résistance contre différents pathogènes après traitement par le BABA (Pajot, 2005b ; Trouvelot <i>et al.</i> 2006)	39
Tableau 4	Des réponses différentes selon le type d'élicitation. Exemple avec la pourriture bactérienne de l'arum <i>Zantedeschia aethiopica</i>	41
Tableau 5	Effet de traitements à la coronalone sur différentes espèces végétales (dans Schüler <i>et al.</i> 2004)	43
Tableau 6	Effets du sulfate de vanadyle, du BTH et de MeJA sur la production d'acide rosmarinique par des cellules de <i>Lavandula vera</i>	54
Tableau 7	Effets de MeJA et de <i>Pythium aphanidermatum</i> sur la production d'acide rosmarinique par des cellules de <i>Coleus blumei</i>	55
Tableau 8	Élicitation de chevelu racinaire de <i>Salvia miltiorhiza</i> par l'ion argent et par un extrait de levure pour la production d'acide rosmarinique	56
Tableau 9	Synthèse d'acide rosmarinique par élicitation de racines villeuses d' <i>Ocimum basilicum</i>	57
Tableau 10	Élicitation de cellules de <i>Silybum marianum</i> pour la synthèse de silymarine	59
Tableau 11	Production de composés phénoliques par des cellules d' <i>Hypericum perforatum</i> selon les différentes modalités mesurées (24 h après élicitation fongique)	60
Tableau 12	Élicitation d' <i>Hypericum perforatum</i> par <i>Aspergillus niger</i> pour la production d'hypericine	61
Tableau 13	Élicitation des voies de synthèses d'hypericine et d'hyperforine	62
Tableau 14	Synthèse des résultats portant sur l'élicitation des voies de synthèse des composés phénoliques	64
Tableau 15	Production de tanshinones par <i>Salvia miltiorrhiza</i> suite à une élicitation et une potentialisation	66
Tableau 16	Élicitation des voies de synthèse de l'azadirachtine chez <i>Azadirachta indica</i>	67
Tableau 17	Élicitation de la saponine synthétisée par <i>Panax ginseng</i>	68
Tableau 18	Élicitation des voies de synthèse d'ether spiroketal-enol chez <i>Tanacetum sp.</i>	69
Tableau 19	Synthèse des résultats portant sur l'élicitation des voies de synthèse des composés terpéniques.	70
Tableau 20	Elicitation de <i>Papaver somniferum</i> par des champignons pour la production de sanguinarine	71
Tableau 21	Synthèse de divers métabolites secondaires par des plantes d' <i>Ocimum basilicum</i> à la suite d'une élicitation par le chitosan	72

Masse molaire des différentes molécules testées en tant qu'éliciteurs

Dans la troisième partie portant sur les élicitation, les concentrations des produits testés sont parfois indiquées en nombre de moles par litre (unité M).

Le tableau ci-dessous indique les masses molaires de ces différents produits afin de passer aisément des concentrations molaires à des concentrations massiques, en multipliant les concentrations molaires précisées dans le rapport par la masse molaire correspondante afin d'obtenir une concentration en grammes/litre de solution.

Molécule	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)
Acide acétylsalicylique	$C^9H^8O^3$	180,16
ACC, acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique	$C_4H_7O_2N$	101,1
Acibenzolar-S-méthyl	$C_8H_8N_2OS_2$	210,28
Acide abscissique	$C_{15}H_{20}O_4$	264,32
Acide jasmonique (JA)	$C_{12}H_{16}O_3$	210,27
Acide salicylique (SA)	$C_7H_6O_3$	138,12
Acide rosmarinique (RA)	$C_{18}H_{16}O_8$	360,3
Acide tannique	$C_{76}H_{52}O_{46}$	1701,2
Argent (ion)	Ag^+	107,87
Jasmonate de méthyle	$C_{13}H_{20}O_3$	224,3
Nickel (Sulfate de)	$NiSO_4$	154,76
Nitrate d'argent	$AgNO_3$	169,87
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	34,014
Sélénium (Sélénite)	Se	78,96

Références citées dans le chapitre « Rappels sur les mécanismes de défenses naturelles des plantes »

- Angelova Z *et al.* (2006). Elicitation of plants. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. **20(2)**: 72-82.
- Antoniw J.F., Ritter C.E. *et al.* (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol. **47**: 79-87.
- Bargain V. (2005). Un nouveau concept de protection et stimulation des cultures. Réussir fruits et légumes **238**: 50-51.
- Belhadj A., Saigne C. *et al.* (2006). Methyl Jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. J. Agric. Food Chem. **54**: 9119-9125.
- Benhamou N., Picard K. (2000). La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. Phytoprotection **80**: 137-168.
- Bochu V. (2007). Système de défenses naturelles des plantes. Synthèse bibliographique, Iteipmai, 31 p.
- Boughton A.J., Hoover K. & Felton G.W. (2006). Impact of chemical elicitor applications on greenhouse tomato plants and population growth of the green peach aphid, *Myzus persicae*. Entomologia experimentalis et Applicata **120**: 175-188.
- Bressan R. (2007). PR5 proteins: From plant defense against microbes to energy management in animals. *In* : Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Doorn, 10-14/05/2007, p. 11.
- Buhot N. (2003). Rôle des élicitines et des protéines de transfert de lipides dans l'induction de la résistance des plantes à leurs agents pathogènes. Thèse [en ligne], Université de Bourgogne. http://www.inra.fr/theses/these-integrale/Theses/buhot/html/these_front.html
- Choudhary D.K., Johri B.N. *et al.* 2008 Volatile as priming agents that initiate plant growth and defence responses. Current Science **94(5)**: 595-604.
- Daire X., Wendehenne D. *et al.* (2006). Analysis of early events involved in signaling pathways leading to plant defense responses. IOBC/wprs Bull. **29(8)**: 5-7.
- Delledone M., Zeier J., Marocco A. et Lamb C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**: 13454-13459.
- Dicke M. (1994). Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. J. Plant Physiol. **143**: 465-472.
- Dixon R. et Palva N. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The plant cell **7**: 1085-1097.
- Edreva A. (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen. Appl. Plant Physiology **31(1-2)**: 105-124.
- Flor H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. **9**: 275-296.
- Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E. *et al.* (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol. Plant-Microbe Interact. **19(7)**: 711-724.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. **43**: 205-227.
- Gozzo F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. J. Agric. Food Chem. **51**: 4487-4503.
- Greenberg & Yao (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. Cell. Microbiol. **6**: 201-211.
- Grisebach H & Ebel J. (1978). Phytoalexins, chemical defense substances of higher plants? Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **17**: 635-647.

- Hammond-Kosck K.E. & Parker J.E. (2003). Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr. Opin. Biotechnol. **14**: 177-193.
- He P.-Q., Tian L. *et al.* (2006). Induction of volatile organic compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. and its resistance to *Botrytis cinerea* pers. by burdock oligosaccharide. Journal of Integrative Plant Biology **48(5)**: 550-557.
- Heil M. *et al.* (2007). Induction and priming of an indirect plant defense in nature. *In*: Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Doorn, 10-14/05/2007, p. 52.
- Herms D.A. & Mattson W.J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. Quarterly Review of biology **67(3)**: 283-335.
- Howell J.T. & Davis M.R. (2005). Plant defense mechanisms against fungal pathogens: polygalacturonase inhibitor proteins. Canadian Journal of Plant Pathology **27(1)**: 5-15.
- Klarzynski O., Fritig B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. Comptes-rendus de l'Académie des sciences – Séries III – Sciences de la Vie **324(10)**: 953-963.
- Klarzynski O., Fablet E. *et al.* (2006). Principes physio-activateurs des filtrats d'algue marine – Etat des connaissances sur leurs effets sur la physiologie des plantes. Phytoma – la défense des végétaux **597**: 10-12.
- Koornneef A., Ritsema T. *et al.* (2007). Cross-talk between SA- and JA- dependent defense pathways coincides with a cellular increase in glutathione. *In*: Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Doorn, 10-14/05/2007, p. 24.
- Lecourieux D., Ranjeva R. & Pugin A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. New Phytologist **171**: 249-269.
- Martinez C. et Loison M. (2006). Stifénia, un exemple concret. Phytoma – la défense des végétaux **598**: 42-45.
- Molinari S. & Loffredo E. (2006). The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. Physiol. Mol. Plant Pathol. **68**: 69-78.
- Nürnberg T. & Brunner F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr. Opin. Plant Biol. **5**: 318-324.
- Nürnberg T., Brunner F. *et al.* (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunol. Rev. **198**: 249-266.
- Nürnberg T. & Lipka V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Molecular Plant Pathology **6(3)**: 335-345.
- Pajot E., Aveline N., Monot C., Le Corre D., Silué D. (2005). Stimulation des défenses naturelles : Efficacité de protection et voies d'action en cultures légumières [en ligne]. http://www.inh.fr/rencontresduvegetal/pp3_pajot.pdf
- Pajot E. (2005)b. Stimulateurs de défenses naturelles : les nouveaux alliés de la protection raisonnée. PHM – revue horticole **468**: 10-14.
- Pajot E. & Regnault-Roger C. (2008). Stimulation des défenses naturelles des plantes et résistance induite : une nouvelle approche phytosanitaire ? *In* : Regnault-Roger C., Philogène B & Vincent C. coord. (2008). Biopesticides d'origine végétale – 2^e édition. Editions Tec & Doc, Paris, 337 pages.
- Radman R., Saez T., Bucke C. and Keshavarz T. (2003). Review – elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol. Appl. Biochem. **37**: 91-102.
- Regnault Roger C. (coord) (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Editions Tec & Doc, Paris, 1013 pages.
- Rouxel T. (1989). Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. Agronomie **9**: 529-545.
- Sels J., Venlans E. *et al.* (2007). The Arabidopsis thaliana plant defensin PDF1.1: a new element in plant defense against necrotrophic pathogens. *In* : Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Doorn, 10-14/05/2007, p. 12.

Tapio Palva E. *et al.* (2007). Cross-talk in biotic and abiotic stress signaling. *In*: Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Doorn, 10-14/05/2007, p. 23.

Trouvelot S., Dubreuil C., *et al.* (2006). La potentialisation des défenses naturelles des plantes. Phytoma – la défense des végétaux **598**: 38-40.

Turlings T.C.J., Rasmann S. *et al.* (2007). Belowground tritrophic signaling between maize roots and entomopathogenic nematodes. *In* : Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Doorn, 10-14/05/2007, p. 17.

Turner J.G., Ellis C. & Devoto A. (2002). The jasmonate signal pathway. The Plant Cell **14** (supplement): S153-S164.

Université du Havre ; Angelot P. et Chartreux S. (2006). Les stimulateurs de défenses naturelles [en ligne]. <http://www.univ-lehavre.fr/enseign/fst/projets/sdn/index.htm>

Van Breusegem F., Vranova E. *et al.* (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Science **161**: 405-414.

Van Loon L.C. & Van Strien E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. **55**: 85-97.

Von Dahl C.C. & Baldwin I.T. (2007). Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. J. Plant Growth Regul. **26**: 201-209.

Zhao J. *et al.* (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology advances **23**: 283-333.

Références citées dans le chapitre « L'application de SDN - stimulateurs de défenses naturelles »

AFPP (dernière consultation en juillet 2008). Produits alternatifs de lutte [en ligne] http://www.afpp.net/commande/commissions/meth_altern.htm

Amborará E., Aziz A, Trotel-Aziz P. *et al.* (2004). Essais d'emploi du chitosan contre *Botrytis cinerea*. Phytoma – la défense des végétaux **571**: 26-29.

Andreu A. B., Guevara M. G. *et al.* (2006). Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. Pest Manag. Sci. **62**: 162-170.

Attia F., Errakhi R., Martinez L. *et al.* (2007). La calcite micronisée, pourquoi et comment elle aide à mieux gérer le stress hydrique. Phytoma – La Défense des Végétaux **609**: 28-31.

Aziz A., Poinssot B. *et al.* (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Mol. Plant-Microbe Interact. **16(12)**: 1118-1128.

Bargain V. (2005). Un nouveau concept de protection et stimulation des cultures. Réussir fruits et légumes **238**: 50-51.

Bayer Cropscience (2005). Stimulation des défenses naturelles : le Fosétyl-Al continue de livrer ses secrets. Phytoma **587**: 65.

Belhadj A., Saigne C. *et al.* (2006). Methyl Jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. J. Agric. Food Chem. **54**: 9119-9125.

Benhamou N., Picard K. (2000). La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. Phytoprotection **80**: 137-168.

Bishnoi U.R. and Payyavula R.S. (2004). Effect of plant activators on disease resistance and yield in tomato and canola. *In*: 4th international crop science congress, Brisbane, Australia, 26/09-01/10/2004, pp 1-5.

Blanchard A. & Limache F. (2005). Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). Rapport bibliographique, ENSAM, ENSAR et INA P-G, 15 pages.

- Blogowski A. (2008). Evolutions de la réglementation française applicable aux produits d'origine naturelle. In : AFPP. Actualités réglementaires en protection des plantes [CD Rom]. AFPP, Alfortville.
- Boughton A.J., Hoover K. & Felton G.W. (2006). Impact of chemical elicitor applications on greenhouse tomato plants and population growth of the green peach aphid, *Myzus persicae*. Entomologia experimentalis et Applicata **120**: 175-188.
- Brisset M.N., Chartier R., Didelot F. et al. (2005). Inducteurs de défenses naturelles des plantes – Potentialités contre les bioagresseurs du pommier et du poirier. Phytoma – la défense des végétaux **581**: 20-24.
- Brunner F., Rosahl S. et al. (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. The EMBO Journal **21(24)**: 6681-6688.
- Bubici G., Amenduni M. et al. (2006). Efficacy of acibenzolar-S-methyl and two strobilurins, azoxystrobin and trifloxystrobin, for the control of corky root of tomato and verticillium wilt of eggplant. Crop protection **25**: 814-820.
- Buhot N. (2003). Rôle des élicitines et des protéines de transfert de lipides dans l'induction de la résistance des plantes à leurs agents pathogènes. Thèse [en ligne], Université de Bourgogne. http://www.inra.fr/theses/these-integrale/Theses/buhot/html/these_front.html
- Copping & Duke (2007). Review – Natural products that have been used commercially as crop protection agents. Pest Management Science **63** : 524-554.
- Damoiseau L. (2008). L'an deux d'ABIM – marchés, produits, lois : tout nouveau tout bio. Phytoma – la défense des végétaux **613**: 18-21.
- De Capdeville G., Wilson C. et al. (2002). Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. Phytopathology **92**: 900-908.
- De Capdeville G., Beer S.V. et al. (2003). Pre- and post-harvest harpin treatments of apples induce resistance to blue mold. Plant dis. **87**: 39-44.
- Deogratias J.M. (2007). Evaluation de phytostimulants dans l'amélioration de la qualité sanitaire des plantes de pélagonium contre *Botrytis cinerea*. GIE Fleurs et plantes du Sud-Ouest, Villenave d'Ornon, 16 pages. Compte-rendu n° 07A2-7.
- Dijan-Caporalino C. et al. (2002). Plantes nématicides et plantes résistantes aux nématodes. In : Regnault-Roger C. et al. Biopesticides d'origine végétale. Editions Tec & Doc, Paris, 337 pages.
- Dinh S.Q., Joyce D.C. et al. (2007). Effects of combined methyl jasmonate and ethylene-inhibitor treatments against *Botrytis cinerea* infecting Geraldton waxflower. Acta Hort. (ISHS) **755**: 527-532.
- E-phy, catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages, des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France [en ligne]. <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>.
- Esnault D. et Klarzynski O. (2005). La laminarine, Quel apport en situation de septoriose résistante aux Qol ? Phytoma – la défense des végétaux **587**: 49-51.
- Euzen M., Bernardon Méry A. & Joubert J.-M. (2008). Contre la chlorose ferrique, activer la physiologie de la nutrition en fer. Phytoma – la défense des végétaux **616**: 42-44.
- Falcon-Rodriguez A. B. et al. (2007). Evaluation of chitosan as an inhibitor of soil-borne pathogens and as an elicitor of defence markers and resistance in tobacco plants. Spanish J. Agr. Res. **5(4)**: 533-541.
- Fardeau J.-C. et Jonis M. (2004). Phytostimulants et éliciteurs pour végétaux : propriétés et garanties réglementaires. Alter Agri **65**: 21-24.
- Felix G., Duran J.D. et al. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant J. **18**: 265-276.
- Fellbrich G., Romanski A. et al. (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. Plant J. **32**: 375-390.
- Gent D.H. & Schwartz H.F. (2005). Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. Plant Dis. **89**: 631-639.
- Cény L., Bernardon Méry A. & Larrive G. (2007). Un filtrat d'algues agit sur la vigne et le pommier. Phytoma – la défense des végétaux **609**: 37-40.

- Gindro K., Godard S. *et al.* (2007). Peut-on stimuler les mécanismes de défense de la vigne ? Une nouvelle méthode pour évaluer le potentiel des éliciteurs. Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic. **39(6)**: 377-383.
- He P.-Q., Tian L. *et al.* (2006). Induction of volatile organic compounds of *Lycopersicon esculentum* Mill. and its resistance to *Botrytis cinerea* pers. by burdock oligosaccharide. Journal of Integrative Plant Biology **48(5)**: 550-557.
- Hindumathy C. K. *et al.* (2006). Spore cell wall components of *Aspergillus niger* elicit downy mildew disease resistance in pearl millet. Phytopathology / Mycology **34(1)**: 72-86.
- Jakab G., Ton J. *et al.* (2005). Enhancing *Arabidopsis* salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. Plant Physiol. **139**: 267-274.
- Kamble A. and Bhargava S. (2007). β -aminobutyric acid-induced resistance in *Brassica juncea* against the necrotrophic pathogen *Alternaria brassicae*. J. Phytopathology **155**: 152-158.
- Klarzynski O., Plesse B. *et al.* (2000). Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. Plant Physiol. **124(3)**: 1027-1038.
- Klarzynski O., Fablet E. *et al.* (2006). Principes physio-activateurs des filtrats d'algue marine – Etat des connaissances sur leurs effets sur la physiologie des plantes. Phytoma – la défense des végétaux **597**: 10-12.
- Koga J., Kubota H. *et al.* (2006). Cholic acid, a bile acid elicitor of hypersensitive cell death, pathogenesis-related protein synthesis, and phytoalexin accumulation in rice. Plant Physiol. **140**: 1475-1483.
- Konstantinidou-Doltsinis S., Markellou E. *et al.* (2006). Efficacy of Milsana®, a formulated plant extract from *Reynoutria sachalinensis*, against powdery mildew of tomato (*Leveillula taurica*). BioControl, **51(3)** 375-392.
- Krebs H., Dorn B. & Forrer H.-R. (2006). Lutte contre le mildiou de la pomme de terre avec des préparations à base de plantes. Revue suisse Agric. **38(4)**: 203-207.
- Lang J.M., Gent D.H. & Schwartz H.F. (2007). Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with bacteriophages and a plant activator. Plant Dis. **91**: 871-878.
- Larkindale J. & Huang B. (2005). Effects of abscisic acid, salicylic acid, ethylene and hydrogen peroxide in thermotolerance and recovery for creeping bentgrass. Plant Growth Regulation **47**: 17-28.
- La Torre A., Spera G. & Lolletti D. (2004). Activity of natural products against courgette powdery mildew. Comm. Appl. Biol. Sci. **69(4)**: 671-678.
- Liu Z., Latunde-Dada A.O. *et al.* (2007). Effects of pre-treatment with acibenzolar-S-methyl or *Leptosphaeria biglobosa* on development of phoma stem canker (*L. maculans*) epidemics on winter oilseed rape. Aspects of Applied Biology **83**: 71-74.
- Luzzatto T., Yishay M. *et al.* (2007). Efficient, long-lasting resistance against the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* in calla lily provided by the plant activator methyl jasmonate. Plant Pathology **56**: 692-701.
- Marinello S., Burzi P. L. *et al.* (2006). Induction of defence related enzymes and systemic resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in sugar beet against *Cercospora beticola* Sacc. IOBC/WPRS Bull. **29(8)**: 75-78.
- Martinez C. et Clergue T. (2006). Lutte contre l'oïdium de la vigne - Un nouveau stimulateur de défenses naturelles. Phytoma – la défense des végétaux **591**: 40-41.
- Martinez C. et Loison M. (2006). Stifénia, un exemple concret. Phytoma – la défense des végétaux **598**: 42-45.
- Molinari S. & Loffredo E. (2006). The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. Physiol. Mol. Plant Patho. **68**: 69-78.
- Murugan M. & Dhandapani N. (2006). Induced systemic resistance activates defense responses to interspecific insect infestations on tomato. Journal of vegetable science **12(3)**: 43-62.
- Nürnberg T. & Brunner F., (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr. Opin. Plant Biol. **5**: 318-324.

- Pajot E. (2005). « Phytostimulants » : une réglementation française à adapter au contexte européen. PHM – revue horticole **468**: 8-9.
- Pajot E. (2005)b. Stimulateurs de défenses naturelles : les nouveaux alliés de la protection raisonnée. PHM – revue horticole **468**: 10-14.
- Pajot E., Aveline N., Monot C., Le Corre D., Silué D. (2004). Stimulation des défenses naturelles : Efficacité de protection et voies d'action en cultures légumières [en ligne]. http://www.inh.fr/rencontresduvegetal/pp3_pajot.pdf
- Pajot E., Maurice S., Guerrand J. *et al.* (2007). TTF₅, fertilisant pouvant stimuler des défenses naturelles de plantes contre des pathogènes sur tabac, fraise et vigne, travaux sur un mélange. Phytoma – La Défense des Végétaux **603**: 38-41.
- Pickett J.A., Birkett M.A. *et al.* (2007). Developments in aspects of ecological phytochemistry: the role of *cis*-jasmonate in inducible defence systems in plants. Phytochemistry **68**: 2937-2945.
- Sanz-Alferez S. *et al* (2008). SAR induction in tomato plants is not effective against root-knot nematode infection. Eur. J. Plant Pathol. **120**: 417-425.
- Sasek V. *et al.* (2007). Effect of SAR chemical nducers and *Leptosphaeria maculans* elicitors on defense responses of oilseed rape. **In** : Joint International Workshop on PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, Doorn, 10-14/05/2007, p. 110.
- Schüler G., Mithöfer A., Baldwin I.T. *et al.* (2004). Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. FEBS Letters **563**: 17-22.
- Stapel O., Deogratias J.-M., Langlois A. *et Pajot E.* (2006). Efficacité prometteuse sur les moyens alternatifs de protection des cultures. *In* : 3^{ème} conférence internationale sur les moyens alternatifs de protection des cultures [CD Rom]. AFPP, Paris.
- Stapel O., Guerrand J., Aubree N. *et Pajot E.* 2005. Effet des biostimulants sur les défenses naturelles des plantes en culture de cyclamen et de chrysanthème. PHM – revue horticole **468**: 15-20.
- Stapp (2005). Efficacité des phytostimulants contre les maladies et ravageurs en cultures ornementales : développement d'une nouvelle stratégie phytosanitaire. Astredhor, Paris, 46 pages. Comptendu du programme national STEPP-05PN19.
- Stapp (2006). Efficacité des phytostimulants contre les maladies et ravageurs en cultures ornementales : développement d'une nouvelle stratégie phytosanitaire. Astredhor, Paris, 31 pages. Comptendu du programme national STEPP-06PN01.
- Stapp (2007). Efficacité des phytostimulants contre les maladies et ravageurs en cultures ornementales : développement d'une nouvelle stratégie phytosanitaire. Astredhor, Paris, 45 pages. Comptendu du programme national STEPP-07PNSDN.
- Treutter D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. Environ. Chem. Lett. **4**: 147-157.
- Trotel-Aziz P., Couderchet M. *et al.* (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology **114**: 405-413.
- Trottin-Caudal Y., Fournier C. *et al.* (2004). Efficiency of plant extract from *Reynoutria sachalinensis* (Milsana) to control powdery mildew on tomato (*Oidium neolycopersici*). *In*: Roche L., Edin M., *et al.* (coord.) Colloque international tomate sous abri, protection intégrée - agriculture biologique, CTIFL, Avignon, France, 17-18 et 19 septembre 2003, pp. 11-15.
- Trouvelot S., Dubreuil C., *et al.* (2006). La potentialisation des défenses naturelles des plantes. Phytoma – la défense des végétaux **598**: 38-40.
- Trouvelot S., Varnier A.-L. *et al.* (2008). A β -1,3-Glucan sulfate resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like Cell Death. Molecular Plant-Microbes Interactions **21(2)**: 232-243.
- Van Breusegem F., Vranova E. *et al.* (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Science **161**: 405-414.
- Yang B., Yonghong G. *et al.* (2007). Postharvest harpin treatment suppresses decay and induces the accumulation of defense-related enzymes in Hami melons. Acta Hort. (ISHS) **731**: 439-450.

Références citées dans le chapitre « La production de métabolites secondaires par élicitation »

- Bais H. P., Walker T. S. *et al.* (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 983-995.
- Conceição L., Ferreres F. *et al.* (2006). Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry* **67**: 149-155.
- Chen H., Chen F. *et al.* (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme and Microbial Technology* **28**: 100-105.
- Croteau R., Kutchan T. & Lewis N. (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B., Griswold W., Jones R. eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 1250-1268.
- Eliasova A., Repcak M. & Pastirova A., Quantitative changes of secondary metabolites of *Matricaria chamomilla* by abiotic stress. *Z. Naturforsch.* **59c**: 543-548.
- Facchini P.J., Johnson A.G. *et al.* (1996). Uncoupled defense gene expression and antimicrobial alkaloid accumulation in elicited opium poppy cell cultures. *Plant Physiol.* **111**: 687-697.
- Facchini P.J. (1998). Temporal correlation of tyramine metabolism with alkaloid and amide biosynthesis in elicited opium poppy cell cultures. *Phytochemistry* **49(2)**: 481-490.
- Ge X. & Wu J. (2005). Induction and potentiation of diterpenoid tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by β -aminobutyric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 183-188.
- Georgiev M., Kuzeva S. *et al.* (2006). Enhanced rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture through elicitation with vanadyl-sulfate. *Z. Naturforsch.* **61c**: 241-244.
- Georgiev M., Kuzeva S. *et al.* (2007). Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 301-304.
- Hu X., Neill S.J. *et al.* (2003). The mediation of defense responses of ginseng cells to an elicitor from cell walls of *Colletotrichum lagerarium* by plasma membrane NAD(P)H oxidases. *Acta Botanica Sinica* **45(1)**: 32-39.
- Jeong G.-T., Park D.-H. *et al.* (2005). Production of antioxidant compounds by culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer hairy roots. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121-124**: 1147-1157.
- Jeong G.-T. & Park D.-H. (2006). Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129-132**: 436-446.
- Kim H.-Y., Chen F. *et al.* (2005). Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) *J. Agric. Food. Chem.* **53**: 3696-3701.
- Kwok D. & Shetty K. (1996). *Pseudomonas* spp. mediated regulation of total phenolic and rosmarinic acid levels in shoot-based clonal lines of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Food Biochemistry* **20**: 365-377.
- Lila M.A. (2006). The nature-versus-nurture debate on bioactive phytochemicals: the genome versus *terroir*. *J. Sci. Food Agric.* **86**: 2510-2515.
- McCue & Shetty K. (2002). Clonal herbal extracts as elicitors of phenolic synthesis in dark-germinated mungbeans for improving nutritional value with implications for food safety. *Journal of Food Biochemistry* **26**: 209-232.
- Merkli A., Christen P. & Kapetanidis I. (1997). Production of diosgenin by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Plant Cell Reports* **16(9)**: 632-636.
- Nutrialpha (Mise à jour 10/08/2007). Acide rosmarinique/Rosmarinique acid [en ligne]. http://www.nutrialpha.com/fiche261-1_Acide_rosmarinique--rosmarinique.html

- Perry P. L. & Shetty K. (1999). A model for involvement of proline during *Pseudomonas*-mediated stimulation of rosmarinic acid levels in oregano shoot clones. Food Biotechnology **13(2)**: 137-154.
- Prakash G. & Srivastava A. K. (2008). Statistical elicitor elicitation studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. Biochemical Engineering Journal **40**: 218-226.
- Sánchez-Sampedro M. A. *et al.* (2005). Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Journal of biotechnology **119**: 60-69.
- Shetty K. & Wahlqvist M. (2004). A model for the role of the proline linked pentose-phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. Asia Pacific J. Clin. Nutr. **13(1)**: 1-24.
- Sirvent T. & Gibson D. (2002). Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. Physiology and Molecular Plant Pathology **60**: 311-320.
- Szabo E., Thelen A., Petersen M. (1999). Fungal preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Reports **18**: 485-489.
- Stojakowska A. *et al.* (2008). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of spiroketal enol ether diacetylenes in feverfew hairy root culture. Acta Societatis Botanicorum Poloniae **77(1)**: 17-21.
- Tumova L. & Backovska M. (1999). Chitosan and the flavonoid production. Herba Polonica **XLV(2)**: 114-119.
- Xu M.J., Dong J.F. & Zhu M.J. (2005). Nitric oxide mediates elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependant signal pathway. Plant Physiology **139**: 991-998.
- Yan Q. *et al.* (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Science **170**: 853-858.
- Yang R., Potter T. P. *et al.* (1997). Tissue culture-based selection of high rosmarinic acid producing clones of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) using *Pseudomonas* strain F. Food Biotechnology **11(1)**: 73-88.

