



(ph. BBV)

tester

TTF5, fertilisant pouvant stimuler des défenses naturelles de plantes contre des pathogènes

Sur tabac, fraise et vigne, travaux sur un mélange

Emmanuel Pajot*, Sandy Maurice*, Jérôme Guerrand*, Nion Chirapongsatonkul**, Patrice de Ruffray**, Serge Kauffmann**, François-Xavier Maxant*** et Henri du Mécac***

Les éliciteurs sont des substances capables de provoquer des réactions de défense chez les végétaux, qui sécrètent alors des molécules s'opposant à l'implantation ou au développement d'agents pathogènes. L'avancée de la recherche fondamentale et appliquée permet aujourd'hui de proposer des formulations d'éliciteurs pour la protection des végétaux. Nous présentons ici des travaux sur un composé d'extraits d'algues, d'extraits d'acides aminés et de matières fertilisantes développé par la société Tribo Technologies. Codé TTF5, il est autorisé comme fertilisant sous le nom de Sémafort. Il a montré des effets significatifs sur plusieurs couples plante/pathogène lors de travaux menés à l'Institut de biologie moléculaire des plantes (IBMP) de Strasbourg (CNRS) et au laboratoire Bretagne Biotechnologies Végétales (BBV).

* BBV, Bretagne Biotechnologies Végétales.

** Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS (UPR2357). 12, rue du Général-Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex.

*** Tribo Technologies.

(1) nldr : sur l'oïdium du fraisier, voir notre n° 601 de février 2007, pp. 24 à 27.

La stimulation des défenses naturelles des plantes à l'aide de composés appelés éliciteurs constitue une nouvelle stratégie de protection des cultures alternative aux pesticides ou aux plantes transgéniques. L'usage de polysaccharides comme éliciteurs est fondé sur leur implication connue dans les interactions plantes/micro-organismes en tant que signaux moléculaires, et sur leur biodégradabilité.

Des éliciteurs polysaccharidiques issus d'algues marines sont capables d'induire une large panoplie de réponses de défense chez les plantes, ceci en l'absence de toute infection. L'induction de cette large gamme de réponses antiparasitaires est gage de leur efficacité. Elle leur permet de conférer des résistances suffisantes pour protéger les cultures contre des maladies récurrentes.

Nous avons étudié dans ce cadre le TTF5, associant des extraits d'algues, des matières fertilisantes et des extraits d'acides aminés.

Au CNRS Strasbourg sur tabac

Le laboratoire du CNRS à Strasbourg a conduit des expériences afin de tester l'hypothèse que ce composé agissait en stimulant les défenses naturelles des plantes. La plante test est le tabac, *Nicotiana tabacum* L. Le produit a été pulvérisé sur les plantes et on a évalué l'accumulation de protéines aux activités antiparasitaires, les protéines PR (pathogenesis-related).

Des protéines PR s'expriment

La figure 1 montre que le traitement a induit l'expression d'une batterie de protéines PR dont certaines sont des marqueurs de la voie de signalisation de l'acide salicylique (dont le dérivé le plus connu est l'aspirine), et d'autres sont des marqueurs de la voie de l'éthylène.

Très clairement, TTF5 possède une très forte activité d'induction de réponses de défense chez le tabac. Il induit l'expression de mar-

queurs de plusieurs voies de signalisation indiquant qu'un large spectre de réponses de défense est activé, participant certainement à l'activité de protection induite.

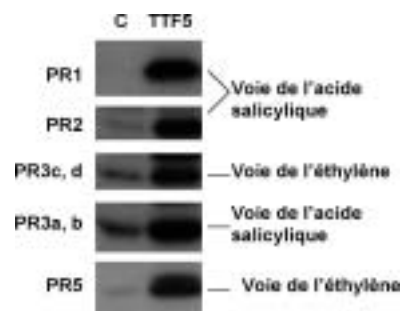
Quel composant ? Leur association !

Nous avons également mené une étude pour identifier quel composant de TTF5 serait déterminant pour son activité biologique.

Nous avons traité des tabacs avec l'extrait d'algues, l'extrait d'acides aminés et les matières fertilisantes. Aucun des trois, dans l'expérience illustrée par la figure 2, n'a induit l'expression de protéines PR. Ceci suggère que c'est la combinaison des trois types de constituants qui confère son activité au produit.

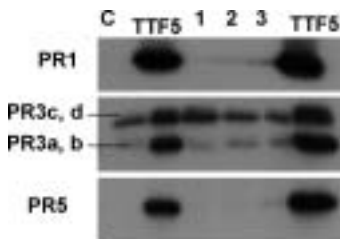
Des expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre le rôle et la contribution de chacun des éléments de la préparation en terme d'élicitation de réponse de défenses et de résistance. Une innovation majeure de TTF5 semble reposer sur la mise en synergie de plusieurs constituants. Les résultats sont fortement encourageants en terme d'application en traitements phytosanitaires.

Figure 1 - Expression de protéines PR (Pathogenesis-related) chez le tabac traité avec TTF5.



Les protéines sont révélées par immuno-détection à l'aide d'anticorps spécifiques 3 jours après traitement par TTF5. C, contrôle.

Figure 2 - Contribution des éléments constituants de TTF5 à l'activité biologique.



Les protéines sont révélées par immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques 3 jours après traitements. C, contrôle. 1, extrait d'algues. 2, matières fertilisantes d'origine minérale. 3, extrait d'acides aminés.

À BBV, le fraisier après la laitue

Dans le cadre de sa mission d'intérêt régional, BBV recherche et contribue au développement de méthodes de protection des cultures alternatives aux pesticides et plus respectueuses de l'environnement. Depuis plus de dix ans, le laboratoire développe des méthodes adaptées à l'évaluation des stimulateurs des défenses naturelles, ou éliciteurs.

Suite à un premier essai assez prometteur sur le pathosystème laitue-mildiou, il a évalué l'intérêt du TTF5 contre l'oïdium du fraisier, sur lequel il est impératif d'identifier de nouvelles méthodes de protection, à la fois pour réduire les risques d'apparition de résistance aux fongicides autorisés et contribuer à la réduction d'emploi des pesticides conventionnels⁽¹⁾.

Mesurer l'effet, et le comprendre

Plusieurs études ont été menées. Dans un premier temps, l'efficacité de protection après un traitement préventif au TTF5 a été évaluée à l'aide d'un pathotest mis au point au sein du laboratoire de pathologie végétale de BBV.

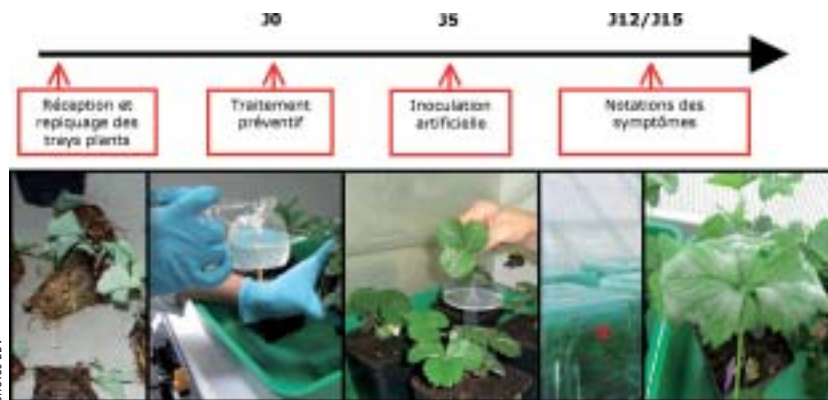
Ensuite, des essais destinés à mieux comprendre le mode d'action du TTF5 ont été menés. Tout d'abord, son effet sur la germination des spores d'oïdium, parasite strict, a été évalué ; puis son effet sur le métabolisme de défense des plants de fraisier a été étudié. Pour cela trois paramètres des multiples réponses de défense possibles ont été mesurés chez les fraisiers traités ou non avec le TTF5.

Tous les essais présentés dans cette étude ont été menés sur de jeunes plants de fraisier (trays plants) de la variété Elsanta.

Effet protecteur en conditions contrôlées

L'efficacité du TTF5 a été évaluée au cours de 4 essais indépendants (répétitions) dont les conditions sont résumées ci-après. La figure 3 présente de manière simplifiée les principales étapes de ce test.

Figure 3 - Représentation schématique du dispositif d'évaluation en conditions contrôlées de l'efficacité du produit TTF5 vis-à-vis de l'oïdium du fraisier après un seul cycle de traitement. L'inoculation artificielle a lieu 5 jours après traitement, qui représente le temps zéro (Jo).



Cinq plants par modalité

Au cours d'un essai, par modalité, 5 plants de fraisier sont traités à un stade moyen de 4-5 feuilles. Ainsi, par modalité une vingtaine de feuilles sont traitées puis notées 12 à 15 jours plus tard en fonction du niveau de développement du pathogène.

Cependant, entre le traitement et le moment de notation, il apparaît en moyenne 5 à 6 nouvelles feuilles n'ayant pas reçu de produit (feuilles néoformées). Leur notation permet, en parallèle, d'évaluer le niveau de rémanence de la protection induite par le traitement.

Les notations sont réalisées à partir d'une échelle à 9 classes basée sur l'échelle officielle mise au point par le SRPV Aquitaine en août 1989.

Ces essais évaluent le TTF5 appliqué à la dose de 0,75 % v/v. Cette modalité, au cours des divers essais, a été comparée à trois modalités témoins : témoin « eau », référence chimique fongicide (*Topaze* appliqué à la dose de 0,05 % v/v), référence SDN (l'acibenzolar-S-méthyle, éliciteur connu dans la spécialité *Bion MX*, analogue de l'acide salicylique, codé ASM et appliqué à la dose de 0,05 % v/v).

L'application des modalités par pulvérisation foliaire est réalisée préventivement cinq jours avant inoculation artificielle calibrée.

Comme on le voit figure 3, la lecture des symptômes est réalisée 7 à 10 jours après l'inoculation artificielle, soit 12 à 15 jours après le traitement.

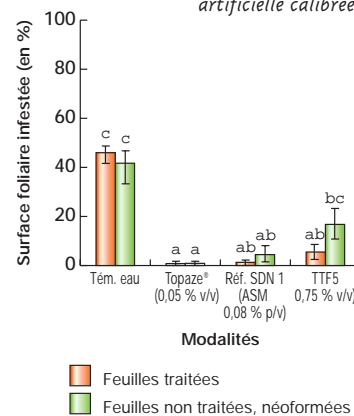
Efficacité de protection

L'expression des résultats est effectuée sous forme de surface foliaire infestée (Figure 4).

La pression parasitaire moyenne obtenue au cours des 4 essais sur la modalité témoin « eau » est stable avec respectivement 46 % et 42 % de surface foliaire « oïdiée » pour les feuilles traitées et néoformées.

Alors que le niveau de développement de l'oïdium sur les feuilles traitées est nul sur les modalités références « fongicide » et « SDN » (respectivement 0,8 et 1,3 % de surface infestée), la modalité TTF5 0,75 % présente une efficacité proche avec une surface foliaire moyenne oïdiée de 5 %.

Figure 4 - Étude de l'effet du TTF5 sur le développement de l'oïdium du fraisier après une application foliaire réalisée 5 jours avant inoculation artificielle calibrée.



La notation réalisée sur les feuilles traitées et non traitées, 7 à 10 jours après inoculation, permet d'évaluer la rémanence du TTF5 par comparaison aux références fongicides (*Topaze*) et éliciteur de synthèse (ASM). Les lettres représentent les groupes homogènes suite à l'analyse statistique (ANOVA avec $\alpha=5\%$ et test LSD de Fisher après transformation).

Rémanence de la protection induite

La figure 4 nous permet de conclure que la rémanence de la protection induite par le TTF5, sur les feuilles néoformées, reste moyenne (surface foliaire moyenne infestée égale à 17 %) par comparaison aux deux références.

Afin de préciser ce point, la comparaison de la protection induite par le TTF5 sur des feuilles du même âge traitées et non traitées mériterait d'être faite. En effet la sensibilité à l'oïdium évaluée sur les feuilles néoformées, plus sensibles dans nos conditions, ne permet pas de conclure précisément sur ce point et permet seulement de déduire des tendances.

Caractérisation du mode d'action

Dans un premier temps, en parallèle des essais de criblage, des tests de mesure de l'effet anti-germinatif du TTF5 sur les spores d'oïdium ont été menés. Ces essais permettent de compléter

les hypothèses établies sur l'origine de l'efficacité (mode d'action) des produits évalués.

Ensuite, l'effet sur le métabolisme de défense des plants de fraisier a été étudié.

Évaluation de l'effet antigerminatif sur les spores

Pour tester l'effet antigerminatif du TTF5, des spores fraîches de *Sphaerotheca macularis* (agent responsable de l'oïdium du fraisier, souche locale) sont mis en contact avec les produits à évaluer. Pour une même modalité trois répétitions sont réalisées et, pour chaque produit, deux concentrations sont évaluées (dose N et 2N), la dose N correspondant à la dose appliquée au cours des tests de protection. Pour chaque répétition, on observe 100 spores par modalité et on prend comme pourcentage de spores germées la valeur moyenne des 3 répétitions.

Pas d'effet anti-germinatif direct

Les résultats du tableau 1 montrent que le TTF5 a très peu d'effet sur la germination des spores d'oïdium par comparaison aux références fongicides et ASM. Notons que l'ASM, à côté de son mode d'action éliciteur bien connu, a un effet fongicide significatif sur la germination des spores d'oïdium.

Quant au TTF5, à la dose N utilisée, son effet anti-germinatif est trop faible pour expliquer l'efficacité de protection constatée, au contraire de la référence chimique fongicide.

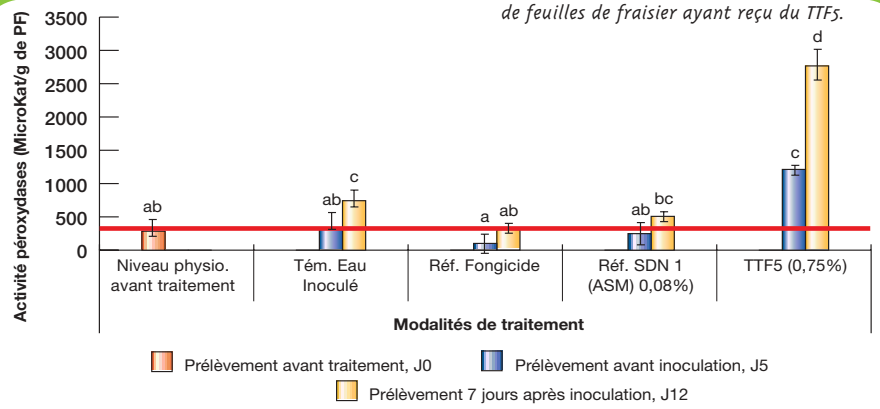
Afin de mieux cerner le mode d'action à l'origine de l'effet du TTF5, l'étude de son effet sur l'accumulation de certains marqueurs de défense est donc nécessaire.

Évaluer l'effet sur le métabolisme de défense des plants

Lors d'une résistance induite par un éliciteur, de nombreuses réponses de défense peuvent être mises en place au niveau des cellules végétales et de la plante entière pour contrer l'agression du pathogène.

Parmi ces réponses, nous avons cherché à mesurer l'effet d'un traitement au TTF5 sur l'accumulation des enzymes peroxydases (PR 9) et glucanases (PR-2), protéines PR connues pour leur implication dans certains mécanismes de défense des plantes.

Figure 5 - Mesure de l'effet du TTF5 sur le métabolisme de défense de feuilles de fraisier ayant reçu du TTF5.



Cet effet est mesuré par le dosage de l'activité des peroxydases (Protéines de défenses PR-9) 5 jours après traitement, avant inoculation puis 12 jours après traitement en présence du pathogène et correspondant à la date de notation des symptômes. Le niveau physiologique de base de l'activité des peroxydases est défini à partir de prélèvements réalisés sur des plants témoin non traités et non inoculés. Les modalités témoins « eau », « fongicide » et « SDN » permettent de discuter les résultats. Les lettres représentent les groupes homogènes suite à l'analyse

En complément, on a dosé les polyphénols, métabolites secondaires produits précocement par les plantes. Leur production fonctionne comme un mécanisme de défense. La mesure des composés phénoliques totaux suit le protocole décrit par Folin et Denis (1916), adapté pour l'usage sur les feuilles de fraisier.

Ces dosages sont réalisés à partir de prélèvements réalisés à trois dates :

- Le premier à J₀ pour connaître la teneur en marqueurs de défense des plants de fraisiers utilisés dans nos conditions d'essai.
- Le deuxième à J₅ (avant inoculation), réalisé sur des feuilles ayant reçu le produit.
- Le dernier après la lecture, à J₁₂, réalisé sur les feuilles traitées et inoculées. Il permet de mesurer l'effet du traitement en conjugaison avec l'agent pathogène pour mettre en évidence un éventuel effet potentialisateur (« priming ») des produits étudiés.

Par modalité et par date, trois échantillons distincts sont dosés et analysés statistiquement (ANOVA = 5 % et test LSD de Fisher).

Une induction des réponses de défenses du fraisier

La figure 5 montre l'effet du TTF5 sur l'activité des peroxydases (Protéines PR-9) et leur forte accumulation dans les feuilles traitées. En effet, en l'absence du pathogène, alors que l'eau présente une activité des peroxydases au

niveau du seuil physiologique du fraisier (J₀), tout comme la référence fongicide et l'ASM, la modalité TTF5 présente une activité des peroxydases 4 fois supérieure à ce seuil. Dans nos conditions l'ASM ne semble pas induire significativement d'accumulation de peroxydases.

À J₁₂, soit 7 jours après inoculation, le développement du pathogène entraîne une légère accumulation de peroxydases dans la modalité témoin « eau inoculé ». Cette accumulation, trop tardive pour entraîner une réduction des symptômes, est consécutive à la reconnaissance du pathogène par une plante peu réactive. Une plante traitée au TTF5 sera plus réactive.

Les données de la figure 5 nous laissent aussi supposer un léger effet « potentialisateur » du TTF5 : ce dernier, en présence du pathogène (dosages à J₁₂) permet de multiplier par deux le niveau de l'accumulation des peroxydases par rapport au niveau à J₅ en l'absence du pathogène. Cette hypothèse devra être vérifiée.

Globalement...

Dans nos conditions (Tableau 2), le TTF5 montre une efficacité de protection (88 % ± 5,9), comparable avec celle des références SDN 1 (ASM) et fongicide (*Topaze* 0,05 %), respectivement 97,2 % ± 1,7 et 98,3 % ± 1,7 d'efficacité. La rémanence du produit sur les feuilles néoformées est significativement inférieure à

Modalités	Concentrations	Taux de germination (% par rapport aux spores totales observées)
Témoin Eau	-	20 ± 2
Réf. SDN (ASM)	N (0,8 g/l)	0
	2 N	0
TTF5	N (0,75 %)	18
	2 N	13,5
Réf. chimique (<i>Topaze</i> ®)	N (0,5 ml/l)	0
	2 N	0

Modalités	Efficacité sur feuilles traitées (en % par rapport à l'eau)	Efficacité sur feuilles néoformées (en % par rapport à l'eau)	Inhibition de la germination (en % par rapport à l'eau)	Induction à J5 (exprimée en % par rapport à la modalité Eau) des...		
				Phénols totaux	PR-9	PR-2
Tém. Eau	0 (c)	0 (c)	0 (a)	0 (a)	0 (ab)	0 (a)
Réf. fongicide (<i>Topaze</i> 0,05 %)	98,3 (a)	97,9 (a)	100 (b)	46 (a)	0 (a)	0 (a)
Réf. SDN 1 (ASM 0,08 %)	97,2 (ab)	89,3 (ab)	100 (b)	158 (a)	0 (ab)	4 299 (b)
TTF5 (0,75 %)	88,0 (ab)	59,8 (b)	9 (a)	30 (a)	268 (c)	3 904 (b)

Synthèse des essais. Les lettres entre parenthèses représentent les groupes homogènes suite à l'analyse statistique.

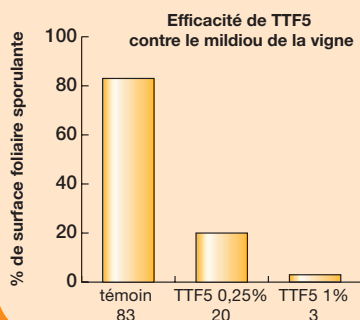
Expérimentations sur la vigne, un effet sur le mildiou

En viticulture plusieurs expérimentations menées par l'INRA et la FREDON semblent confirmer un effet suffisamment significatif de TTF5 sur le mildiou de la vigne pour en faire une solution opérationnelle. En effet l'application de l'éliciteur à raison de 3 à 4 l/ha en début de saison présente dans les premiers tests réalisés un intérêt fort tant en terme de protection que de nutrition.

L'intérêt du TTF5 sur l'oïdium de la vigne semble beaucoup plus limité, rien de significatif n'ayant été observé à ce jour.

Une campagne d'expérimentation en plein champ est prévue. Un travail important de recherche à l'INRA lors de la campagne 2008 permettra de mieux connaître le mode de fonctionnement de TTF5 sur le plan fondamental (activation des voies de défense de la vigne) afin d'établir les corrélations avec les effets de protections constatés au vignoble.

Figure 6 - Essais sous serre réalisés à l'INRA de Dijon sur boutures de Marselan (V. vinifera). Différence entre traitements statistiquement significative (seuil de 5 %).



celle des références fongicide et ASM, éliciteur réputé pour induire une résistance systémique acquise (SAR), ce que confirme ce travail.

Les résultats obtenus mettent en évidence le mode d'action du TTF5.

Ce dernier agit comme un éliciteur en ayant un effet significatif sur l'accumulation de certaines protéines de défense comme les PR-9 et PR-2. Son effet sur l'induction de la synthèse des polyphénols n'est pas significatif. Son effet sur la germination des spores d'oïdium n'est pas significatif lui non plus.

Ce dernier résultat est important : il suggère une absence d'effet fongicide direct, et donc que l'effet significatif contre l'oïdium sur feuille vient bien d'un mode d'action indirect du type éliciteur.

Remerciements : Nous tenons à remercier le Cerafel Bretagne (Morlaix) et le Conseil régional de Bretagne pour leur participation financière à cette étude.

Conclusion

Cette étude montre l'intérêt potentiel du TTF5 dans la maîtrise de certains pathogènes. Plus largement, son effet sur les systèmes de défense des plantes, associé à son efficacité sur d'autres couples plantes-pathogènes, nous suggèrent son intérêt dans le développement de stratégies alternatives et complémentaires à l'emploi des fongicides conventionnels. À l'avenir, sous couvert d'une AMM, il semble envisageable de pouvoir protéger de manière

satisfaisante des plants de fraisier vis-à-vis de l'oïdium à partir d'un programme de traitement utilisant une alternance TTF5/fongicide. Des essais sont en cours afin de définir les meilleurs programmes. En cas de résultats concluants, cela permettrait de diviser par deux les applications de fongicides conventionnels, donc de contribuer à l'objectif de réduction d'emploi des pesticides du plan interministériel de juin 2006. Ceci permettrait aussi d'augmenter la durabilité des fongicides menacés par des risques de résistance.

Résumé

Le TTF5, préparation fertilisante de la société Tribo Technologies associant des extraits d'algue, des extraits d'acides aminés et des matières fertilisantes, semblait avoir des effets protecteurs contre certaines maladies. Des recherches ont été réalisées pour vérifier si le produit a un effet éliciteur (stimulateur de défenses naturelles de plantes). Des essais sur tabac au CNRS de Strasbourg ont montré que le produit stimule la production de protéines PR (pathogenic-related) signe de réaction de défense de la plante ; aucun de ses composants ne le fait à lui seul. Des essais à BBV (Bretagne Biotechnologies végétales) ont montré l'effet du TTF5 contre l'oïdium du fraisier. Le produit n'a pas d'effet fongicide direct sur la germination des spores d'oïdium mais agit sur le métabolisme de la plante (taux de peroxidases ou protéines PR-9, de glucanases ou protéines PR-2, et dans une moindre mesure de polyphénols). Des essais préliminaires sur vigne montrent un effet contre le mildiou.

Mots-clés : éliciteurs, stimulateurs de défense naturelles, TTF5, oïdium du fraisier, mildiou de la vigne, efficacité, mode d'action.

Summary

TESTS ON TOBACCO, STRAWBERRY AND VINES OF TTF5, a fertiliser capable of stimulating the natural defence mechanisms of plants against pathogens

TTF5, a fertilisation product made by Tribo Technologies, combining algae extracts, amino acid extracts and fertilising ingredients, would appear to offer protection against certain diseases. The objective of our trial was to establish whether this preparation could also stimulate the natural defence mechanisms of plants. Tests on tobacco carried out at the Strasbourg branch of the National Scientific Research Institute showed that the product stimulated the production of pathogenic-related (PR) proteins; none of the three components were able to do this alone. Other tests carried out by BBV (Plant Biotechnology Institute of Brittany) showed the effect of TTF5 against strawberry powdery mildew. A study of the mode of action established that the product did not act as a fungicide (no effect on spore germination) but did act on the plant metabolism (especially the content of proteins PR-9 and PR-2). Preliminary trials on grapevines would appear to indicate an effect against downy mildew.

Vitivista
La démarche raisonnée

Le vignoble, les hommes, l'environnement.

Notre enracinement : les grands terroirs de production.

VITIVISTA s'implique avec les viticulteurs qui placent l'exigence qualité au cœur de leurs modes de production et pour mieux répondre aux attentes et aux préoccupations des professionnels. Pour pérenniser et valoriser un exceptionnel patrimoine de variétés viticoles et de terroirs.

Bâtiment E • 1^{er} étage • Parc Cadéra Sud • Avenue Ariane • 33700 MERIGNAC
Tél. 05 56 34 64 04 • Fax 05 56 34 64 05 • info@vitivista.com