

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par :

TAZEBINTE Taoufik

Thème

**Etude de quelques stimulateurs de défenses
naturelles des plantes (SDN)**

Soutenu publiquement le : 22/06/2021.

Devant le jury composé de :

Mme HAMID OUDJANA Aicha	Maître Conférence A	Univ. Ghardaïa	Présidente
Mr BENBEKHTI Zineddine	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examineur
Melle SEDDIKI Malika	Maître Assistant B	Univ. Ghardaïa	Promotrice

Année universitaire 2020/ 2021

Remerciement

En premier lieu, je remercie tout d'abord Allah le tout puissant qui m'a donné de la santé, volonté, et puissance pour réaliser ce modeste travail.

Je remercie mes chers parents, qui m'ont aidé, et Qui m'ont encouragé durant tous mes parcours d'études. Aucune œuvre ne pourra vous récompenser les sacrifices que vous avez accomplis pour moi. Puisse ce modeste travail être une reconnaissance pour vous. Que le bon Dieu vous donne longue vie et bonne santé.

J'ai l'honneur d'exprimer mes profonde gratitude à Melle SEDDIKI Malika d'accepter de m'encadrer et pour son aide, sa disponibilité et patience.

Je tiens également à remercier les membres de jury Mme HAMID OUDJANA Aicha & Mr BENBEKHTI Zineddine, qui m'ont fait l'honneur d'examiner et évaluer mon mémoire.

Mes sincères remerciements à tous les enseignants du département de biologie.

Je remercie également tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour l'élaboration de ce travail.

Un grand merci particulier à mes collègues et mes amis pour leur sympathie, & les bons moments qu'on a passés ensemble.

TAOUFIK

Résumé

L'utilisation des stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN) s'avère une méthode alternative et/ou complémentaire intéressante à explorer, permettant de réduire les intrants pesticides. Ces SDN sont des molécules biologiques capables de déclencher les événements moléculaires, biochimiques et cytologiques menant à l'expression de la résistance chez une plante. En effet, il est important de comprendre les mécanismes mis en place dans la plante, de posséder des outils ou des marqueurs qui nous renseignent sur le statut de résistance de la plante pour évaluer l'efficacité de ces stimulateurs et mieux connaître leur potentiel de protection dans le cadre de cette nouvelle méthode de lutte.

L'objectif de ce travail est basé sur la mise en évidence de quelques expériences effectuées dans des conditions contrôlées, qui élucident l'évaluation d'efficacité des SDN par différentes méthodes d'analyse, comme le dosage des enzymes marqueurs par spectrophotométrie et l'identification des composés organiques volatils et des composés phénoliques par chromatographie.

Mots clés : stimulateurs, défenses, plantes, efficacité, dosage

Abstract

The use of plant natural defenses stimulators (SND) is an interesting alternative and/or complementary method to explore, allowing the reducing of pesticide inputs. These SND are biological molecules capable of triggering the molecular, biochemical and cytological events leading to the expression of resistance in a plant. Indeed, it is important to understand the mechanisms setting up in the plant, to have tools or markers that inform us about the resistance status of the plant to evaluate the effectiveness of these stimulators, and better to know their potential of protection as part of these new methods of struggle.

The objective of this work is based on the highlighting of some experiments carried out under controlled conditions, which elucidate the evaluation of the effectiveness of SND by different analytical methods. Such as the dosage of some marker enzymes by spectrophotometry, identification of volatile organic compounds and phenolic compounds by chromatography.

Key words: stimulators, defenses, plants, efficiency, dosage

المخلص

أثبت استخدام محفزات الدفاع عن النباتات الطبيعية أنه طريقة بديلة أو تكميلية تثير الاهتمام والاستكشاف، والتي تسمح بالتقليل من إدخال مبيدات الحشرات. محفزات الدفاع الطبيعية عند النباتات هي جزيئات بيولوجية قادرة على إثارة الأحداث الجزيئية والكيميائية الحيوية والخلوية التي تؤدي إلى التعبير عن مقاومة النبات. في الواقع، من المهم فهم الآليات الموضوعية في النبات وامتلاك أدوات أو علامات تخبرنا عن حالة مقاومة النبات من أجل تقييم فعالية هذه المحفزات وفهم إمكانيات حمايتها بشكل أفضل، كجزء من مكافحة الجديدة .

يعتمد الهدف من هذا العمل على عرض بعض التجارب التي تم إجراؤها في ظروف مخبرية خاضعة للرقابة، والتي توضح تقييم فعالية هذه المحفزات من خلال طرق تحاليل مختلفة وذلك بمعايرة إنزيمات دالة على دفاع النبات بقياس الطيف الضوئي، وتحديد المركبات العضوية المتطايرة والمركبات الفينولية عن طريق الكروماتوغرافيا .

الكلمات الإستدلالية: دفاع، معايرة، فعالية، محفز، نبات

Table de matières

Remerciement

Résumé

Abstract

الملخص

INTRODUCTION.....1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE4

I. DEFENSES NATURELLES DES PLANTES5

I.1 Mécanismes généraux et moléculaires de défense naturelle chez les plantes.....5

I.1.1 Mécanismes généraux5

I.1.1.1 Différents types de résistance chez les plantes6

I.1.1.1.1 Résistance spécifique induite, L'hypersensibilité7

I.1.1.1.2 Résistance locale acquise (RLA).....7

I.1.1.1.3 Résistance systémique acquise (SAR)8

I.1.1.1.4 Résistance systémique induite (ISR).....8

I.1.2 Mécanismes moléculaires de défense9

I.1.2.1 Reconnaissance9

I.1.2.1.1 Reconnaissance gène pour gène9

I.1.2.1.2 Reconnaissance d'éliciteurs généraux :.....11

I.1.2.2 Événements de transduction du signal intracellulaire.....12

I.1.2.2.1 Transduction précoce12

I.1.2.2.2 Transduction tardive.....12

I.1.2.3 Expressions des défenses13

I.1.2.3.1 Voie de l'acide jasmonique et production de phytoalexines.....13

I.1.2.3.2 L'éthylène.....14

I.1.2.3.3 L'acide salicylique et production des protéines PR.....14

I.1.2.3.4 Autres molécules signal14

II. STIMULATEURS DES DEFENSES NATURELLES DES PLANTES16

II.1 Historique des SDN.....16

II.2 Définition des SDN.....16

II.3 Structures moléculaires de quelques SDN.....17

II.3.1 laminarine.....18

II.3.2	Chitine et autres chito-oligosaccharides.....	18
II.3.3	L'acide salicylique	19
II.3.4	L'acide jasmonique et son méthyle.....	22
II.4	Propriétés des SDN.....	22
II.5	Mode d'action des SDN.....	23
II.5.1	Molécules agissant au niveau de la reconnaissance de l'agent pathogène....	23
II.5.2	Molécules intervenant dans la cascade des signaux.....	24
II.5.3	Molécules de potentialisation.....	24
II.6	Types des SDN.....	25
II.6.1	Eliciteurs d'origine biotique.....	25
II.6.1.1	L'acide cholique.....	25
II.6.1.2	L'utilisation de formes avirulentes de champignons pathogènes	26
II.6.1.3	Oligosaccharides	26
II.6.1.4	Chitosan	26
II.6.1.5	Laminarine	27
II.6.1.6	Protéines issues du genre Phytophthora.....	27
II.6.1.7	Harpines	28
II.6.1.8	Extrait de fenugrec	28
II.6.2	Eliciteurs d'origine synthétique	29
II.6.2.1	BABA (Acide β Amino-Butyrique).....	29
II.6.2.2	Acide salicylique et ses analogues.....	30
II.6.2.3	Acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA).....	31
II.6.2.4	Acibenzolar-S-méthyl (ASM).....	31
II.6.3	Génie génétique.....	32
II.7	Facteurs influençant l'efficacité des éliciteurs	32
II.7.1	Facteurs liés à l'éliciteurs.....	32
II.7.2	Facteurs liés à l'agent pathogènes.....	33
II.7.3	Facteurs liés à la plante	33
II.7.4	Facteurs environnementaux	33
II.8	Quelques SDN disponible sur le marché.....	34
II.8.1	Messenger®	34
II.8.2	Iodus 40®.....	34
II.8.3	Stifénia®	34
II.8.4	Elexa™.....	35
II.8.5	Milsana®.....	35
II.9	Intérêt d'utilisation des SDN dans la protection des plantes.....	36
II.9.1	Intérêt technique.....	37
II.9.2	Intérêt environnemental.....	37
II.9.3	Place dans l'agriculture contemporaine	38

II.10 Avantages et inconvénients des SDN.....	38
II.10.1 Avantages des SDN	39
II.10.2 Inconvénients des SDN	40
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES	41
III. MATERIELS ET METHODES	42
III.1 Objectifs de ce travail	42
III.2 Enzymes marqueurs susceptibles d’être étudiés lors de dosage des activités enzymatiques.....	43
III.2.1 LOX (lipoxygénase)	43
III.2.2 PAL (phénylalanine ammonia-lyase)	44
III.2.3 PPOX (polyphenoloxydase)	44
III.2.4 POD (peroxydases).....	44
III.2.5 APX (ascorbate peroxydase)	45
III.2.6 CAT (catalases)	45
III.2.7 SOD (superoxyde dismutase)	45
III.2.8 GST (glutathion S-transférase)	45
III.2.9 Chitinase	46
III.3 Exemples des méthodes d’évaluation des efficacités des SDN à différents niveaux biologiques et biochimiques.....	46
III.3.1 Niveaux biologiques	46
III.3.1.1 Test d’efficacité du chitosan	46
III.3.1.2 Mesure de l’activité antifongique	47
III.3.2 Niveaux biochimiques	47
III.3.2.1 Mesures des activités enzymatiques	47
III.3.2.1.1 Traitement des feuilles de vigne	47
III.3.2.1.2 Dosage des activités enzymatiques.....	47
III.3.2.2 Identification des composés organiques volatils à action inhibitrice par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	49
III.3.2.2.1 Traitement des feuilles avec l’oligosaccharide de bardane.....	50
III.3.2.2.2 Collecte des composés organiques volatils (VOCs).....	50
III.3.2.2.3 Chromatogramme des composés organiques volatils (VOCs) dans les feuilles de <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill après traitement avec l’oligosaccharide de bardane.....	50
III.3.2.3 Détermination des acides phénoliques par chromatographie liquide à haute performance HPLC	52
III.3.2.3.1 Conception expérimentale	52
III.3.2.3.2 Extraction et analyse par HPLC	52

CONCLUSION	54
REFERENCES.....	56
ANNEXES	66

Liste des figures

Figure 1. Les différentes défenses possibles mises en place par une plante suite à l'attaque par un bioagresseur	6
Figure 2. Réaction hypersensible au virus de la mosaïque du tabac	7
Figure 3. Schéma illustrant l'induction des gènes de défense chez les plantes.	8
Figure 4. Schémas simplifiés de la mise en place des défenses.....	9
Figure 5. Théorie gène pour gène selon Flor	10
Figure 6. Principales familles d'éliciteurs généraux.	11
Figure 7. Modèle hypothétique des événements précoces basé sur la reconnaissance de la cryptogéine par les cellules de tabacs.	13
Figure 8. Représentation schématique de la cascade de signalisation induite par un PAMP.....	15
Figure 9. Structures moléculaires de laminarine et des oligoglucanes	18
Figure 10. Structure de la chitine, du chitosan et des chito-oligosaccharides	19
Figure 11. Voie de biosynthèse de l'acide salicylique.....	20
Figure 12. Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique.....	21
Figure 13. Formules de l'acide salicylique et de ses analogues SDN REF	31
Figure 14. Chromatogramme des composés organiques volatils (VOCs).....	51

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples de plantes exprimant une résistance contre différents pathogènes après traitement par le BABA.....	30
Tableau 2. Liste des SDN actuellement sur le marché	36

Liste des abréviations

<ul style="list-style-type: none">• APX : Ascorbate peroxydase• ASM: Acibenzolar-S-méthyl• BABA: Acide β-aminobutyrique• BTH: Benzothiadiazole• CAT : Catalase• CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène• DTT : Dithiothréitol• GC/MS : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à Spectrométrie de Masse.• GSH : Glutathion réduit• GST : Glutathione S-transférase• HPLC : Chromatographie Liquide Haute performance• HR : Réaction Hypersensible• INA : Acide 2,6-dichloroisonicotinique• ISR : Résistance Systémique Induite• JA : Acide Jasmonique• LOX : Lipoxygénase	<ul style="list-style-type: none">• MeJA : Jasmonate de Méthyle• MES : Acide 2-N-morpholinoéthanosulfonique• PAL : Phénylalanine Ammonia-Lyase• PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern. En français, motif moléculaire propre à un pathogène• PDA : Gélose dextrosée à la pomme de terre• PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyl• POD : Peroxydase• PPOX : Polyphénoloxydase• Protéines PR : pathogenesis-related• PVPP: Polyvinylpyrrolidone• ROS: Reactive Oxygen Species• RSA : Résistance Systémique Acquisée• SA : Acide salicylique• SOD : Superoxyde dismutase• VOCs : Composés Organiques Volatils
---	---

Liste des symboles

g	gramme
g/L	gramme par litre
h	heure
kg	kilogramme
l	litre
mg	milligramme
ml	millilitre
mmol	millimole
min	minute
nmol	nanomole
μmol	micromole
%	pourcentage

Introduction

Introduction

La protection des plantes contre les ravageurs et les agents phytopathogènes est un enjeu majeur en agriculture. Cette thématique reste essentiellement basée sur l'utilisation de molécules chimiques, formulées dans des produits phytopharmaceutiques. Bien que les traitements pesticides apportent des bénéfices non négligeables, ils sont de plus en plus remis en cause pour trois raisons : leur toxicité chimique sur les organismes non cibles (oiseaux, poissons, pollinisateurs, voire hommes), l'apparition de résistance qui leur font perdre en efficacité et enfin la contamination de l'environnement par les résidus (Oerke et Dehne, 2004). De ce fait, des efforts doivent être entrepris pour développer des stratégies de protection innovantes de remplacement ou complémentaires permettant de réduire les intrants pesticides (Dufour, 2011).

En effet, depuis la fin des années 1990, une nouvelle stratégie de protection préventive des plantes a émergé et fait l'objet de nombreuses études dans le monde entier. Elle consiste en des applications foliaires ou racinaires de substances capables de stimuler les réponses de défenses naturelles des plantes (Berthelot *et al.*, 2018). 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 (Lanou *et al.*, 2021).

Ces molécules sont également qualifiées comme « vaccins des plantes », les stimulateurs des défenses naturelles des plantes induisent une attaque, ou mettent en branle les mécanismes moléculaires de défense, qui pourront réagir plus vite et plus efficacement à la prochaine véritable attaque (Blanchard, 2017).

Afin de pouvoir explorer la piste d'utilisation de ces 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 (Dufour, 2011).

Introduction

Du fait, la perception d'un stimulateur de défense naturelle 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 (Walters *et al.*, 2011).

Ce présent mémoire 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 des 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. Enfin, la troisième partie est basée sur la mise en évidence de quelques expériences effectuées dans des conditions contrôlées, qui élucident l'évaluation d'efficacité des SDN par différentes méthodes d'analyses.

Synthèse bibliographique

I. Défenses naturelles des plantes

Au cours de leur coévolution, les plantes et les pathogènes ont développé une relation complexe, résultant d'un échange continu d'informations moléculaires. Les pathogènes ont mis au point toute une série de stratégies offensives pour parasiter les plantes (Benhamou, 1996). En retour, les plantes ont déployé un véritable système immunitaire capable de déceler un danger, ce dernier soit de nature biotique (microorganisme pathogène, insecte ravageur) ou abiotique (stress hydrique, thermique, ionisant, ou pollution) (Benhamou et Rey, 2012).

I.1 Mécanismes généraux et moléculaires de défense naturelle chez les plantes

Les plantes présentent un large éventail de stratégies de défense contre les attaques des pathogènes. Alors, la résistance aux agents pathogènes est assurée par des systèmes de défense préexistants (constitutifs) et induite suite à une élicitation (Angelova *et al.*, 2006).

I.1.1 Mécanismes généraux

On retrouve chez les plantes deux types de défense :

A- La défense passive (constitutive)

Ce type est responsable de la protection des plantes à la plupart des agents pathogènes et des prédateurs, auxquels elles sont confrontées en permanence.

La résistance passive se divise en deux grandes catégories :

- Barrières constitutives physiques (cuticule, épines, stomates, paroi cellulaire).
- Substances chimiques préformées (composés phénoliques, substances antimicrobiennes, lactones, saponines, huiles et composés organo-sulfurés) (Lannou *et al.* 2021).

B- la défense active

Lorsqu'un agent pathogène réussit à contourner la première ligne de défense et que la plante le détecte, un système de résistance actif se met en place. L'objectif est de confiner l'agresseur dans les cellules attaquées (qui peuvent être sacrifiées pour assurer la survie de la plante). Cette interaction plante/pathogène provoque l'activation de plusieurs voies métaboliques afin de :

- Renforcer les barrières externes, comme la paroi, et retarder ou même d'empêcher la pénétration de l'agent pathogène ;
- Favoriser la création d'un environnement toxique, cas où le parasite parviendrait à franchir les barrières structurales nouvellement (Benhamou et Rey, 2012).

I.1.1.1 Différents types de résistance chez les plantes

Il y a trois grands types de résistance ayant pour but commun de bloquer la progression de l'agresseur grâce à des interactions moléculaires continues (système récepteur-émetteur) :

- La résistance spécifique induite qui engendre une interaction gène-pour-gène et qui conduit à une réaction hypersensible (HR).
- La résistance locale acquise (RLA) qui est une forme de résistance généralisée (ne conduit pas obligatoirement à une HR).
- La résistance systémique acquise (SAR), un phénomène de résistance générale induite qui protège efficacement la plante contre son agresseur initial, et la rend également plus performante envers d'autres attaques potentielles (Benhamou et Rey, 2012).

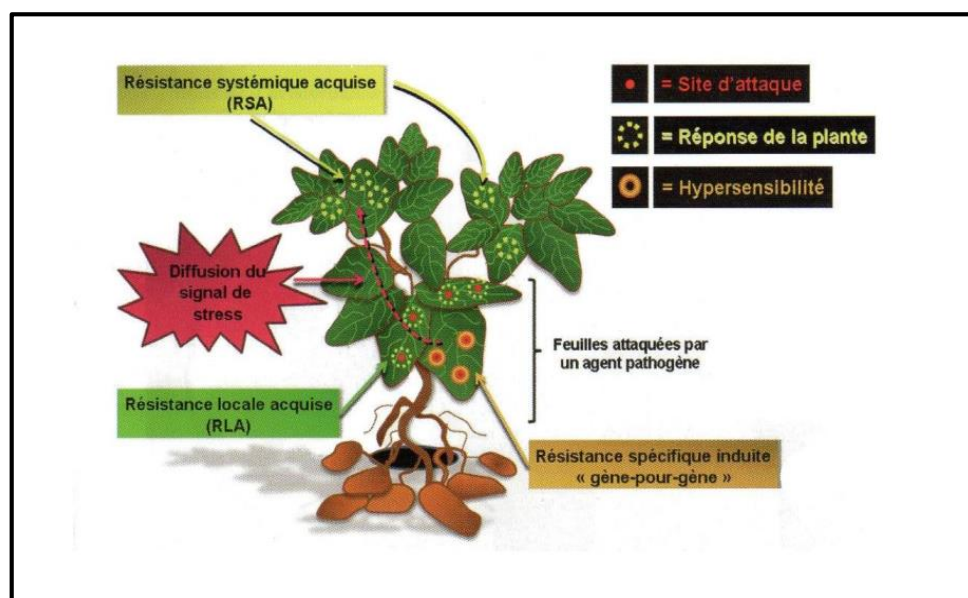


Figure 1. Les différentes défenses possibles mises en place par une plante suite à l'attaque par un bioagresseur (Benhamou, 2009).

I.1.1.1.1 Résistance spécifique induite, L'hypersensibilité

La réaction d'hypersensibilité a pour principale caractéristique de provoquer la mort rapide des cellules végétales entourant le site de pénétration de l'agent pathogène (Heat M C, 2002). Phénotypiquement, la mort programmée de ces cellules se manifeste par la formation de nécroses qui peuvent être localisées (petites taches concentriques) ou très étendue sur une grande surface de feuille (figure 02). La formation de nécrose contribue à confiner l'agent pathogène, empêchant ainsi sa dissémination dans les autres tissus et organes de la plante (Lam *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montrés que des molécules toxiques comme les phytoalexines (composés phénoliques induits) s'accumulaient dans les zones nécrotiques (Balint-kurti, 2019).

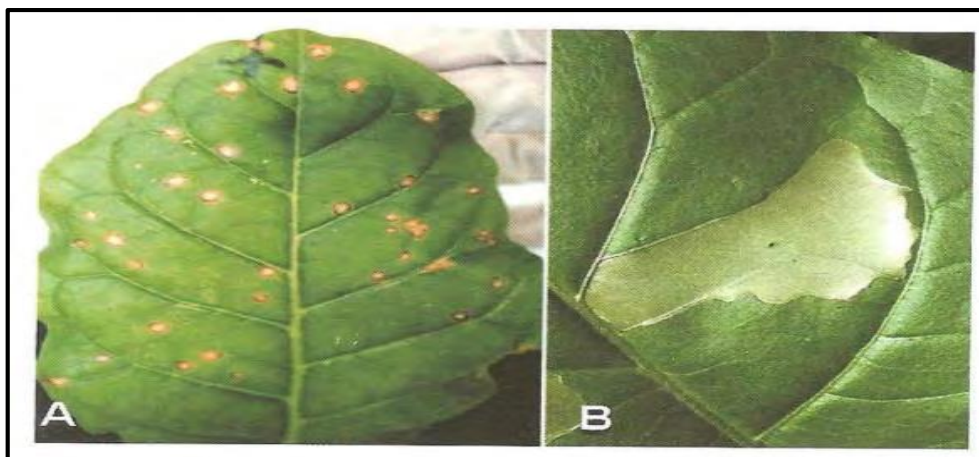


Figure 2. Réaction hypersensible au virus de la mosaïque du tabac (VMT) chez le tabac porteur du gène N de résistance. A. Formation de taches nécrotiques localisées. B. Formation d'une nécrose étendue (Benhamou, 2009).

I.1.1.1.2 Résistance locale acquise (RLA)

La RLA s'exprime au niveau des sites de pénétration potentiels de l'agent pathogène, en marge de la réaction hypersensible. Ces zones sont activement stimulées par des signaux émis par les cellules en état de mort cellulaire (Cordelier *et al.*, 2003). Il s'y produit une synthèse et une accumulation de composés antimicrobiens (dérivés phénoliques comme les phytoalexines) ainsi qu'un renforcement des parois (incorporation de lignine, callose) (Klarzynski et Fritig, 2001)

I.1.1.1.3 Résistance systémique acquise (SAR)

Elle intervient dans les heures qui suivent l'infection, caractérisée par une accumulation de molécules de défense : protéines de stress, phytoalexines, composés structuraux et inhibiteurs de protéases (Benhamou, 2009). La SAR ne reste pas confinée dans les parties infectées de la plante mais s'exprime dans les parties éloignées du site d'attaque (Ryals *et al.*, 1996). Ce type de résistance intervient suite à une cascade d'événements initiés par la détection du signal de stress. Si un des messagers secondaires manque, la plante ne met pas en place sa réaction de défense et la maladie progresse (Vallad et Goodman, 2004).

I.1.1.1.4 Résistance systémique induite (ISR)

L'ISR est une forme de résistance stimulée spécifiquement par des rhizobactéries (Plant Growth Promoting Rhizobacteria ou PGPR) (Van Loon *et al.*, 1998). Les PGPR ont la capacité de stimuler la croissance végétale et de réduire l'impact de certaines maladies (Ramamoorthy *et al.*, 2001). Lors de la résistance systémique induite par les PGPR, de profonds changements métaboliques se mettent en place : production de composés phénoliques comme les phytoalexines, accumulation de protéines de stress (protéines PR), de lignine et de callose (Van Peer *et al.*, 1990).

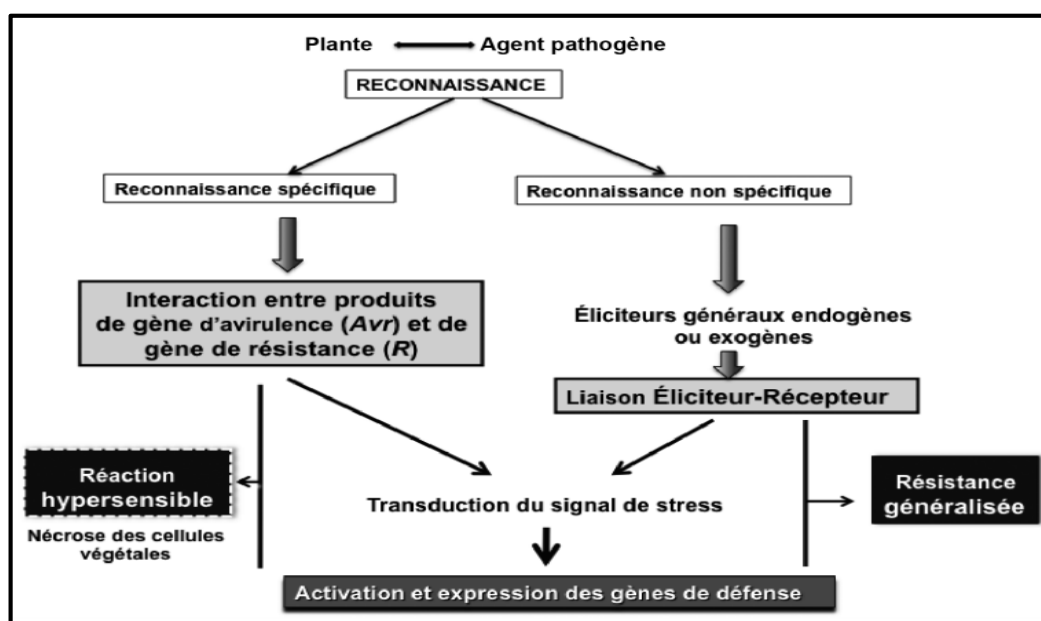


Figure 3. Schéma illustrant l'induction des gènes de défense chez les plantes (Benhamou et Rey, 2012).

I.1.2 Mécanismes moléculaires de défense

La défense se décompose grossièrement en trois phases : reconnaissance, signalisation puis expression des défenses (voir figure 02) :

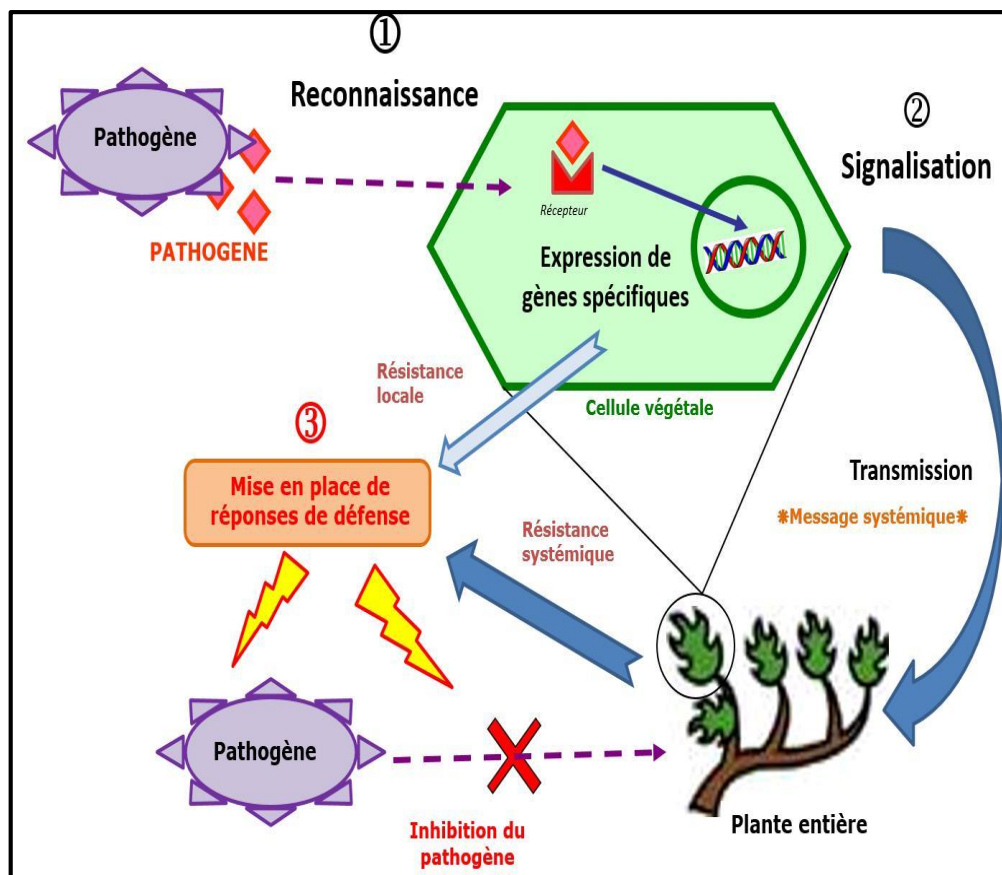


Figure 4. Schémas simplifiés de la mise en place des défenses (Berthelot *et al.*, 2018).

I.1.2.1 Reconnaissance

Il existe deux types de reconnaissance lors d'une agression

I.1.2.1.1 Reconnaissance gène pour gène

Dans le mécanisme de reconnaissance gène pour gène, la résistance de la plante dépend de l'interaction entre le produit du gène d'avirulence 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 (Nürmberger et Brunner, 2002).

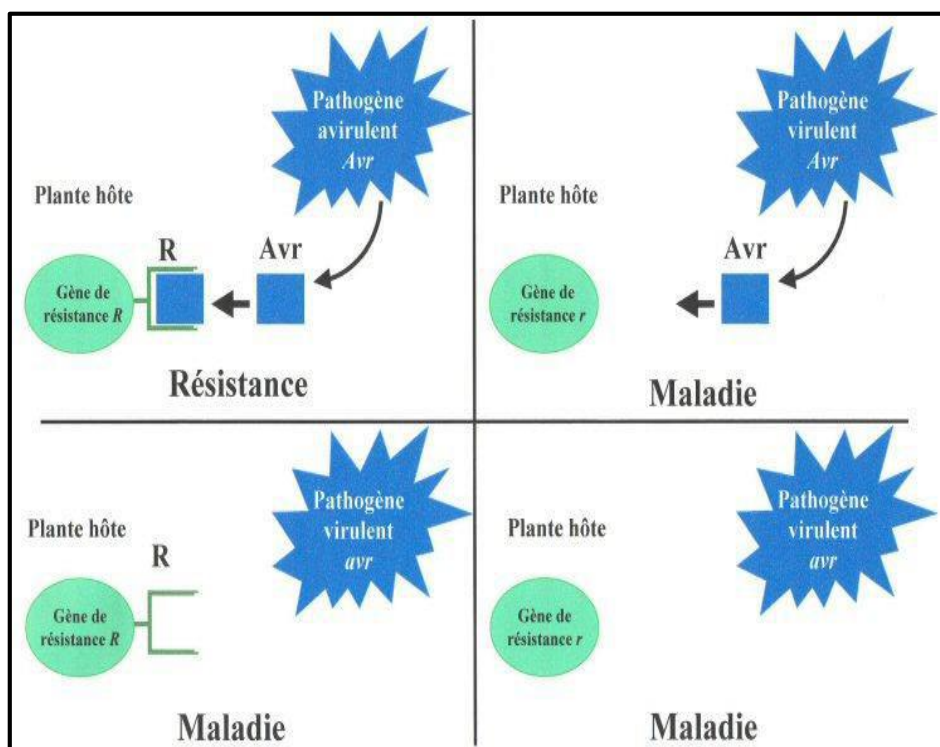


Figure 5. Théorie gène pour gène selon Flor (Sayegh, 2009).

Quand on a un gène d'avirulence, il produit un éliciteur, alors que le gène de résistance produit un récepteur, et si les gènes avirulents et résistants sont traduits, on a donc une reconnaissance entre le pathogène et la plante, ce qui mène à la mise en place des mécanismes de défense. On distingue plusieurs possibilités :

- Absence de reconnaissance, développement du pathogène ;
- Gène avirulent exprimé, mais pas de récepteur ;
- Gène de résistance exprimé, mais pas d'éliciteur ;
- Ni l'un ni l'autre n'est exprimé ;

Donc, la plante a une seule chance sur 4 de ne pas être atteinte. Il faut ainsi qu'au moins un gène (récepteur) résistant soit reconnu par un gène (éliciteur) avirulent pour que la plante ne soit pas infectée (ebiologie.fr, cours de physiologie végétale).

I.1.2.1.2 Reconnaissance d'éliciteurs généraux :

La reconnaissance a lieu par l'intermédiaire d'éliciteurs dits généraux. Ces éliciteurs de nature biotique, peuvent être de deux origines :

- Eliciteurs 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) ;
- Eliciteurs 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. 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 (Nürnberger et Brunner, 2002) ;

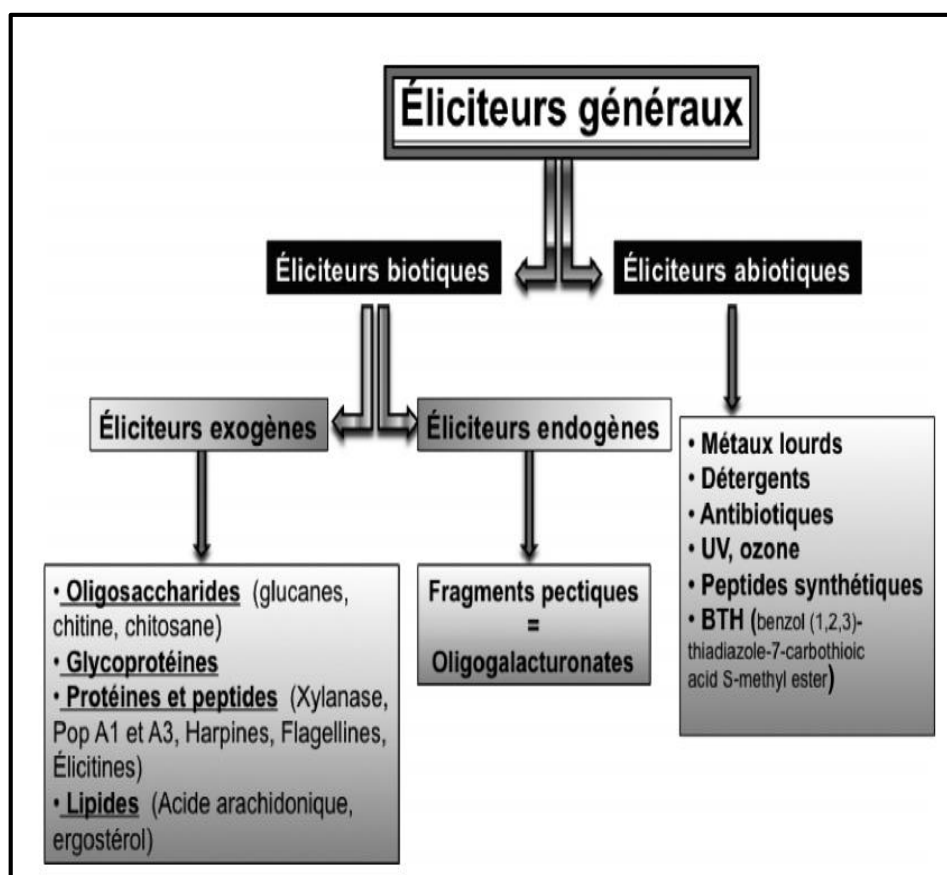


Figure 6. Principales familles d'éliciteurs généraux (Benhamou et Rey, 2012).

I.1.2.2 Événements de transduction du signal intracellulaire

La transduction du signal se divise en deux parties : une transduction précoce et tardive.

I.1.2.2.1 Transduction précoce

Elle va se produire de quelques secondes à quelques heures après l'interaction entre l'éliciteur et le récepteur. Cette réponse se manifeste séquentiellement par une cascade d'événements intracellulaires :

- **Dépolarisation membranaire** ; influx importants d'ions de calcium, protons, efflux d'ions potassium et chlorure ;
- **L'activation de protéines kinases** ; permettant des phosphorylations et déphosphorylations de protéines, pour l'amplification et la propagation du signal ;
- **L'activation 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 (Klarzynski et Fritig 2001) ;
- **Expression des gènes de défense** ; les kinases activent des facteurs de transcription spécifiques des gènes de défense qui entrent ensuite dans le noyau pour se fixer sur des séquences promotrices en amont, ce qui permet la synthèse des molécules de défense (protéines PR, phytohormones, acide salicylique et phytoalexines) (Ebel *et al.*, 1998) ;
- **la production de formes très réactives de l'oxygène (FAO)** ; telles que H₂O₂ et l'oxyde nitrique. Ces molécules ont des actions antimicrobiennes directes et sont aussi impliquées dans le renforcement des parois cellulaires et dans la réaction d'hypersensibilité (Klarzynski et Fritig, 2001).

I.1.2.2.2 Transduction tardive

Elle se produit dans la plupart des cas à la suite d'une résistance locale, il y a une transduction du signal vers les autres cellules non infectées de la plante. Ces cellules seront déjà prêtes à faire face à l'envahisseur. Cette résistance systémique acquise (RSA) peut durer de quelques jours à quelques mois. Il y a trois composés principaux et leurs dérivées qui sont reconnus, pour l'instant, comme étant responsables de cette

transduction, soit l'acide jasmonique, l'acide salicylique et l'éthylène. Ces molécules induisent chacune un type de défense bien particulier dans les cellules infectées ainsi que dans les cellules avoisinantes (Pieterse *et al.*, 2001).

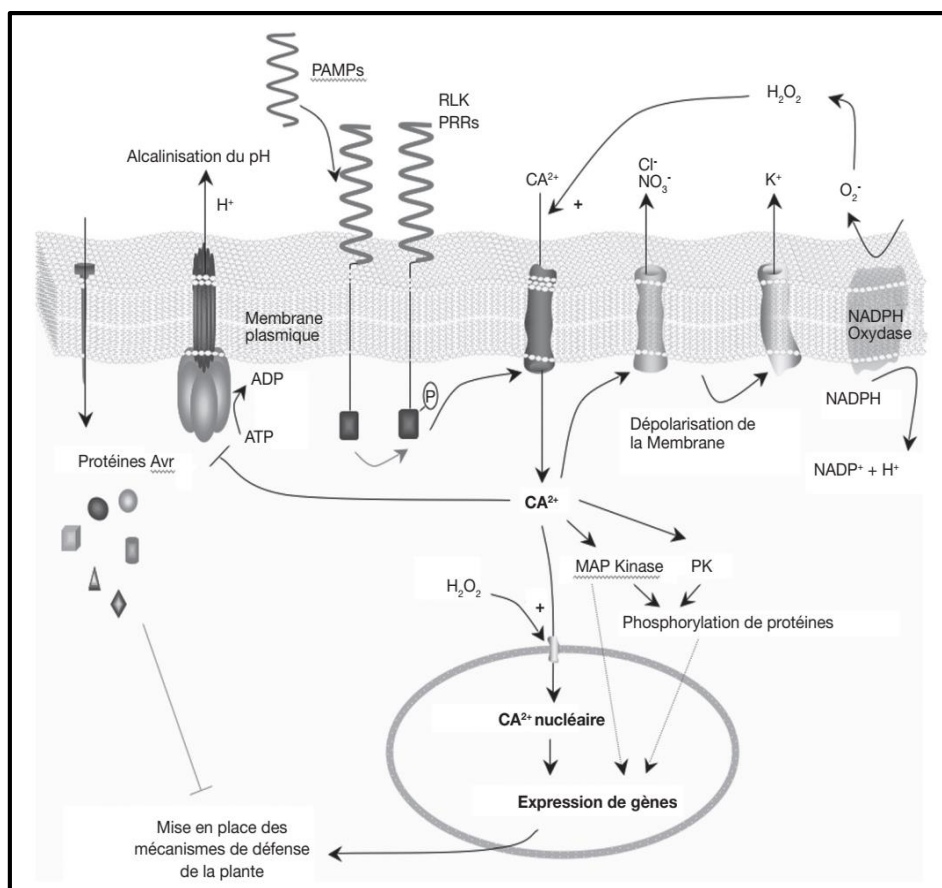


Figure 7. Modèle hypothétique des événements précoces basé sur la reconnaissance de la cryptogème par les cellules de tabacs (Jourdan *et al.*, 2008).

I.1.2.3 Expressions des défenses

I.1.2.3.1 Voie de l'acide jasmonique et production de phytoalexines

Les phytoalexines sont des antibiotiques végétaux synthétisés au cours de la réaction d'hypersensibilité ou lors de la SAR. Leur synthèse peut être provoquée par des métabolites secondaires issus de la réponse précoce comme H_2O_2 ou le monoxyde d'azote NO qui jouent le rôle de signaux. Cependant, la voie royale de synthèse des phytoalexines est celle de l'acide jasmonique. L'acide jasmonique et son ester méthylique sont responsables de la synthèse des enzymes qui produisent

les phytoalexines. Notons au passage que l'acide jasmonique, synthétisé à partir de l'acide linoléique, est un analogue structural des prostaglandines (Blanchard et Limache, 2005).

I.1.2.3.2 L'éthylène

L'éthylène, dérivé de la méthionine, semble aussi fortement impliqué dans la voie de transduction du signal. Cette hormone volatile est impliquée dans plusieurs processus physiologiques et notamment dans la résistance des plantes. Les niveaux d'éthylène augmentent dans les cellules végétales lors de l'infection par des agents pathogènes ou après traitements avec des éliciteurs. Selon l'espèce végétale, l'éthylène peut stimuler des enzymes des voies de biosynthèse de la lignine et des phytoalexines (Ecker, 1995).

I.1.2.3.3 L'acide salicylique et production des protéines PR

L'acide salicylique (AS), un composé phénolique issu de la voie des phénylpropanoïdes et considéré comme une phytohormone, joue un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes, en particulier lors de la résistance locale et la résistance systémique acquise. En plus, il a été montré que la production de l'acide salicylique augmente localement et de manière systémique après infection par différents types d'agents pathogènes (Dempsey et Klissig, 1994).

Les protéines de défense les plus connues sont les protéines PR (*pathogenesis related*). Elles ont la propriété de résister à l'activité de protéases issues de la plante ou du pathogène. Elles peuvent attaquer l'agresseur, comme les chitinases capables de dégrader la paroi des pathogènes. La voie de signalisation principale conduisant à leur synthèse est celle de l'acide salicylique (Blanchard et Limache, 2005).

I.1.2.3.4 Autres molécules signal

On peut citer le monoxyde d'azote, reconnu comme relais assurant et amplifiant des signaux d'origine végétale, Les formes oxydantes agissent aussi comme des molécules signal dans le déclenchement de la mort cellulaire programmée, aussi les radicaux oxydants présents dans la réponse précoce peuvent activer la synthèse

de gènes de défense et provoquer ainsi la synthèse de protéines de défense (Klarzynski et Fritig, 2001).

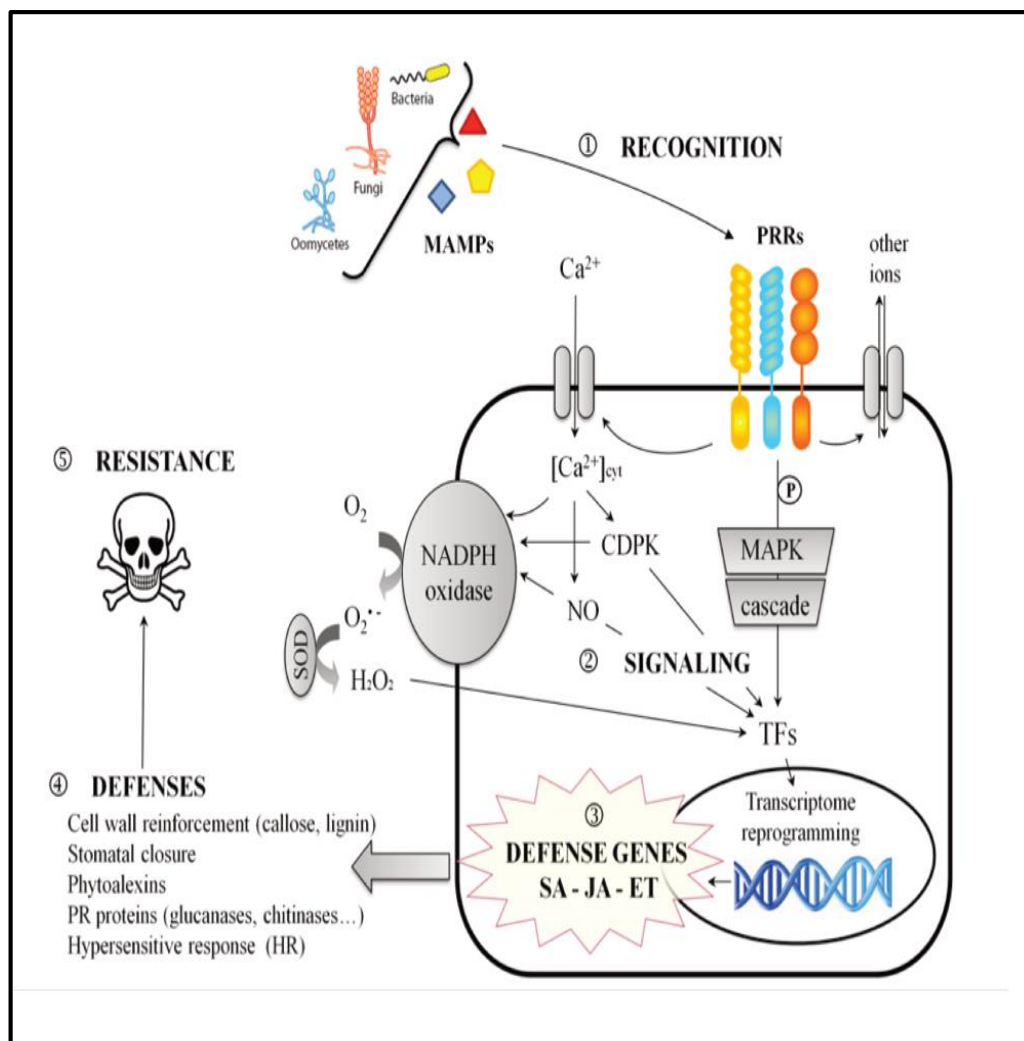


Figure 8. Représentation schématique de la cascade de signalisation induite par un PAMP (Trdà *et al.*, 2015).

La perception du MAMP ou PAMP par son PRR (Pattern recognition receptors)(1) induit une cascade de signalisation (2) incluant des flux d'ions à travers la membrane plasmique, conduisant généralement à une augmentation de la concentration en Ca^{+2} cytosolique, l'activation de protéine kinase dépendante du Ca^{+2} (CDPK) et de mitogen- activatedprotein kinase (MAPK) ainsi que la production de NO et d' H_2O_2 . L'intégration de ces seconds messagers active des facteurs de transcription (TF) qui induisent une reprogrammation du transcriptome, conduisant à la production de phytohormones telle que l'acide salicylique (SA), le jasmonate (JA) ou l'éthylène (ET) ainsi que l'expression de gènes de défense (3) impliqués dans le renforcement pariétal, la fermeture stomatique, la production de phytoalexines et de protéines PR et parfois une réponse hypersensible (HR) au site d'infection (4). Toutes ces réponses de défense contribuent l'induction de résistance (5).

II. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN)

II.1 Historique des SDN

Au cours des dernières décennies, les avancées spectaculaires de nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la résistance induite chez les plantes ont conduit la communauté scientifique à envisager l'exploitation de cette stratégie de défense naturelle dans un contexte conjuguant la préservation de l'environnement et la production agricole intensive. On appelle ces composés qui présentent un grand intérêt en protection des cultures, des stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN) (Benhamou et Rey, 2012).

Les SDN ne sont pas sortis de nulle part et leur arrivée, à un moment charnière de l'histoire de la lutte phytosanitaire, ne doit rien au hasard. Mais c'est d'abord du côté de l'histoire de la phytopathologie qu'il faut se plonger, quand la « relation gène pour gène » d'Harold Henry Flor (1900–1991) offre aux chercheurs après 1947 un modèle simple qui leur permet de dépasser la phytopathologie descriptive du début du siècle et de sélectionner des variétés résistantes pour l'agriculture. Les techniques de laboratoire améliorées permettent ensuite de caractériser en détail les réactions de défense, comme la résistance systémique acquise (SAR) définie par A. Frank Ross (1961), et bientôt, on commence à parler de leur induction (ou élicitation) (Blanchard, 2017).

Le principe des SDN a été énoncé pour la première fois par Peter Albersheim et ses collègues. Ces composés intervenant directement dans la résistance aux organismes pathogènes seront ensuite identifiés, et la génétique des réactions de défense expliquée plus facilement à partir des années 1990 (Klarzynski et Fritig, 2001). Il s'agit toujours de comprendre comment les plantes se défendent et pourquoi certaines résistent alors que d'autres pas, avec enfin l'espoir de faire du « mythe » de l'immunisation des plantes une réalité (Blanchard, 2017).

II.2 Définition des SDN

Un SDN est une molécule biologique capable de déclencher les événements moléculaires, biochimiques et cytologiques menant à l'expression de la résistance chez une plante. Il s'agit donc d'une sorte de « vaccin » susceptible d'activer le « système

immunitaire » de la plante de telle sorte qu'une plante initialement sensible à un agent pathogène devienne résistante (Benhamou et Rey, 2012).

En effet, dans le milieu industriel, les experts du Réseau Mixte Technologique RMT Elicitra, définissent comme SDN toute substance ou tout micro-organisme vivant non pathogène qui, appliqué sur une plante, est capable de promouvoir un état de résistance significativement plus élevé par rapport à une plante non traitée, face à des stress biotiques.

Un SDN n'agit pas directement sur les bio-agresseurs. Il est perçu par la plante comme un message d'alerte. Celle-ci va réagir en préparant ou en mettant en place différents mécanismes de défense qui vont l'aider à mieux résister aux attaques (Berthelot *et al.*, 2018).

Les SDN ne sont pas des inhibiteurs de croissance, car trop souvent sont accusés de détourner le métabolisme de la plante. Du fait, les SDN ont naturellement un coût pour l'organisme, sinon ils n'auraient aucun effet : toute activation des mécanismes de défense mobilise de l'énergie, mais ce coût énergétique est très inférieur à l'impact délétère des maladies (Berthelot *et al.*, 2018). Par ailleurs, il faut prendre garde aux limites entre SDN et biostimulants, la frontière réglementaire est assez claire, car un SDN revendique un effet sur un bio-agresseur (agent pathogène ou ravageur) et est soumis à une autorisation de mise sur le marché (AMM), alors qu'un biostimulant, comme son nom l'indique, stimule le développement des plantes et leur permet de mieux supporter des stress abiotiques (stress salin, stress hydrique, froidetc). Or, la procédure pour les produits de fertilisations, que sont les biostimulants, est beaucoup plus souple (Berthelot *et al.* 2018).

II.3 Structures moléculaires de quelques SDN

D'après (Radman *et al.*, 2003), les éliciteurs sont classés en deux catégories, selon leur nature biotiques ou abiotiques, ou définis en fonction de leurs origines et leurs structures moléculaires. Il existe une grande variété d'éliciteurs biotiques, d'origine animale, végétale, fongique ou bactérienne, citons à titre d'exemple : la minarine et chitine avec ces dérivées. Alors pour les éliciteurs abiotiques sont des composés de nature minérale ou organique. Parmi les nombreux produits chimiques utilisés pour induire la résistance de la plante, nous citons comme exemple, l'acide salicylique (AS) et l'acide jasmonique ou son analogue le méthyl jasmonate.

II.3.1 Laminarine

La laminarine est un polysaccharide de résidus de glucose ramifié, sa structure est similaire au β -glucane un polysaccharide de D-glucose liés par des liaisons $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ ou $\beta(1\rightarrow6)$. Le β -glucane est un composé pariétal de certains champignons et bactéries ainsi que dans les parois cellulaires de la plante sous forme de fragments de callose (Esnault *et al.*, 2005).

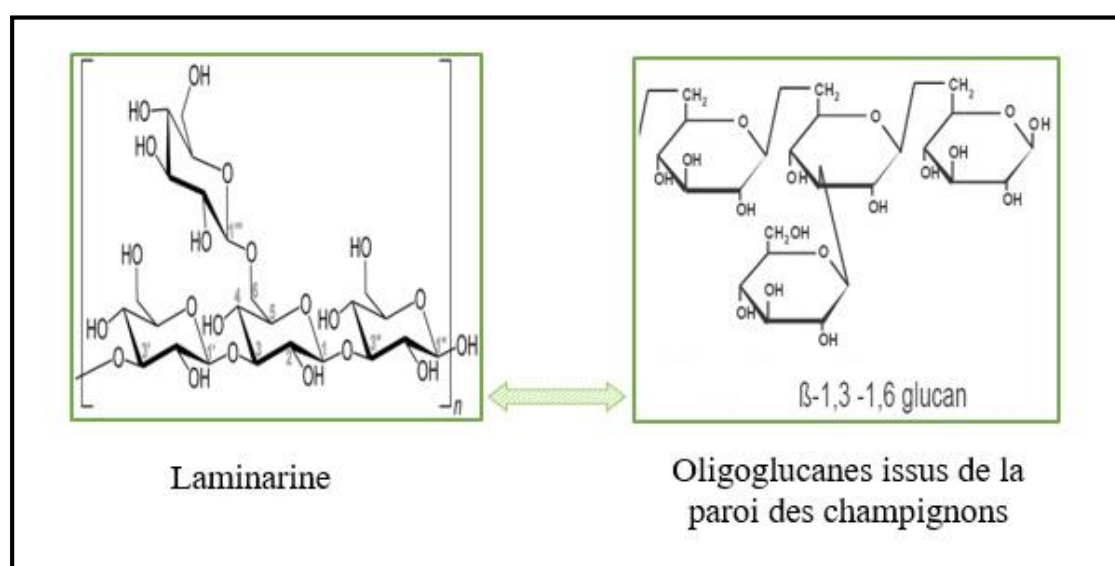


Figure 9. Structures moléculaires de laminarine et des oligoglucanes (Esnault *et al.*, 2005).

II.3.2 Chitine et autres chito-oligosaccharides

La chitine, un polymère linéaire de β -1,4-N-acétylglucosamines (GlcNAc), est le deuxième polysaccharide naturel le plus abondant après la cellulose. La chitine est le composant majeur de la paroi des champignons, mais elle est également présente chez les invertébrés dans la carapace de crustacés, les exosquelettes d'insectes, les œufs de nématodes parasites ou encore chez les protistes et les algues (Bueter *et al.*, 2013). Le chitosan, un dérivé désacétylé de chitine (GlcN), ne se trouve que rarement dans la nature. On retrouve le chitosan chez certains champignons, notamment les Zygomycètes (Chatterjee *et al.*, 2005). La chitine et le chitosan se distinguent par leur degré d'acétylation. Ainsi, la chitine contient plus de 70% d'unités

D-glucosamines acétylées, tandis que le chitosan en possède moins de 30%. Alors que la chitine est neutre, le chitosan est chargé positivement. Les produits d'hydrolyses de la chitine et du chitosan dont le degré de polymérisation (DP) est inférieur à 20 et dont le poids moléculaire est inférieur à 3900 Da forment des oligomères appelés chito-oligosaccharides (Liaqat et Eltem, 2018).

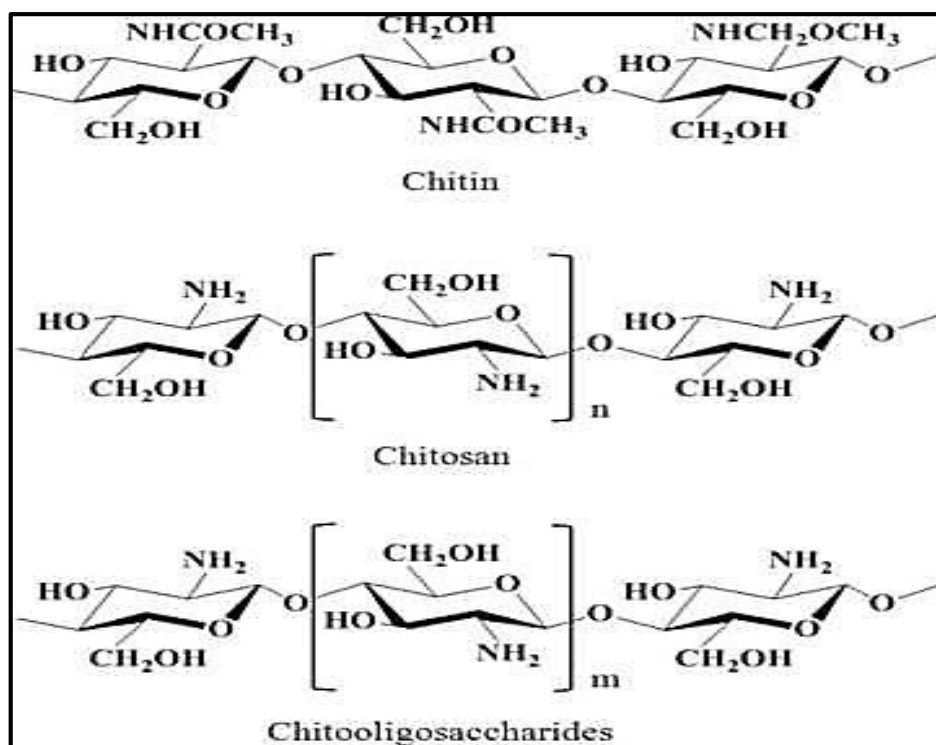


Figure 10. Structure de la chitine, du chitosan et des chito-oligosaccharides (Vo *et al.*, 2015).

II.3.3 L'acide salicylique

L'acide salicylique est un composé phénolique obtenu par la voie de conversion de la phénylalanine en acide trans cinnamique par action enzymatique de la phénylalanine ammonialyase (*PAL*) ou par la voie de l'isochorismate (Figure 11). Des études ont montré que les niveaux de SA augmentent dans les tissus de la plante en réponse à une infection pathogène, et que l'application exogène de SA induit une meilleure résistance à une large gamme de pathogènes (Ryals *et al.*, 1996). Ainsi, des études génétiques ont également montré que l'acide salicylique est requis pour activer rapidement les réactions de défense influencées par plusieurs gènes de résistance, pour l'induction des défenses locales visant à contenir la croissance des pathogènes virulents, et pour l'établissement de la SAR (Ryals *et al.*, 1996). L'expression de plusieurs gènes liés à la pathogénèse (PR gènes) dépend de cette voie de l'acide salicylique et sont

couramment utilisés comme marqueurs de défense des voies SA-dépendantes (PR1, PR2, PR3, PR4, PR5et PR10) (voir figure : 11).

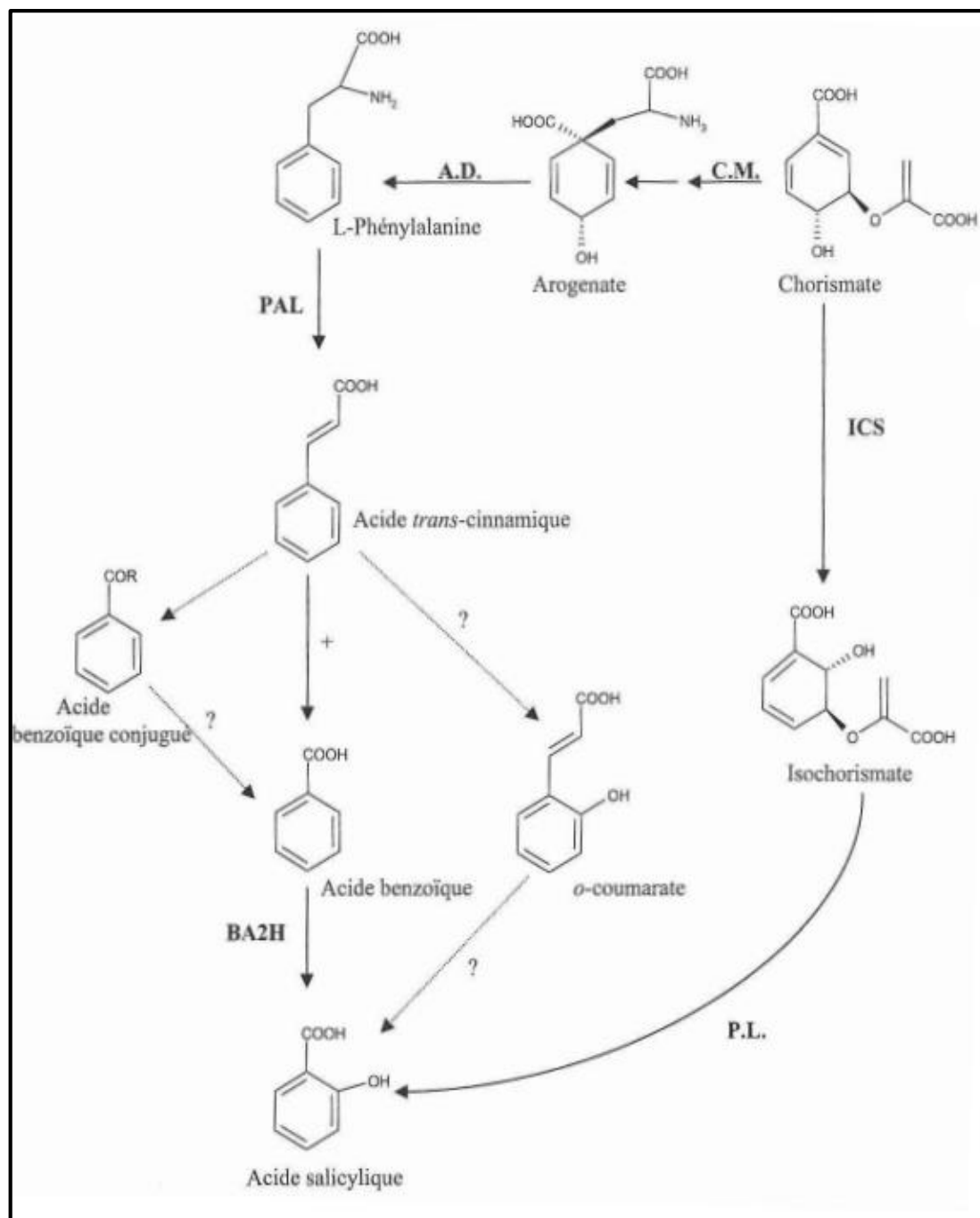


Figure 11. Voie de biosynthèse de l'acide salicylique (Lee *et al.*, 1995 & Wildermuth *et al.*, 2001).

A.D., Arogonate Déhydratase ; BA2H, Acide benzoïque-2-hydroxylase ; C.M., Chorismate Mutase ; ICS, Iso Chorismates Synthase ; PAL, Phénylalanine Ammonia-Lyase ; P.L., Pyruvate Lyase

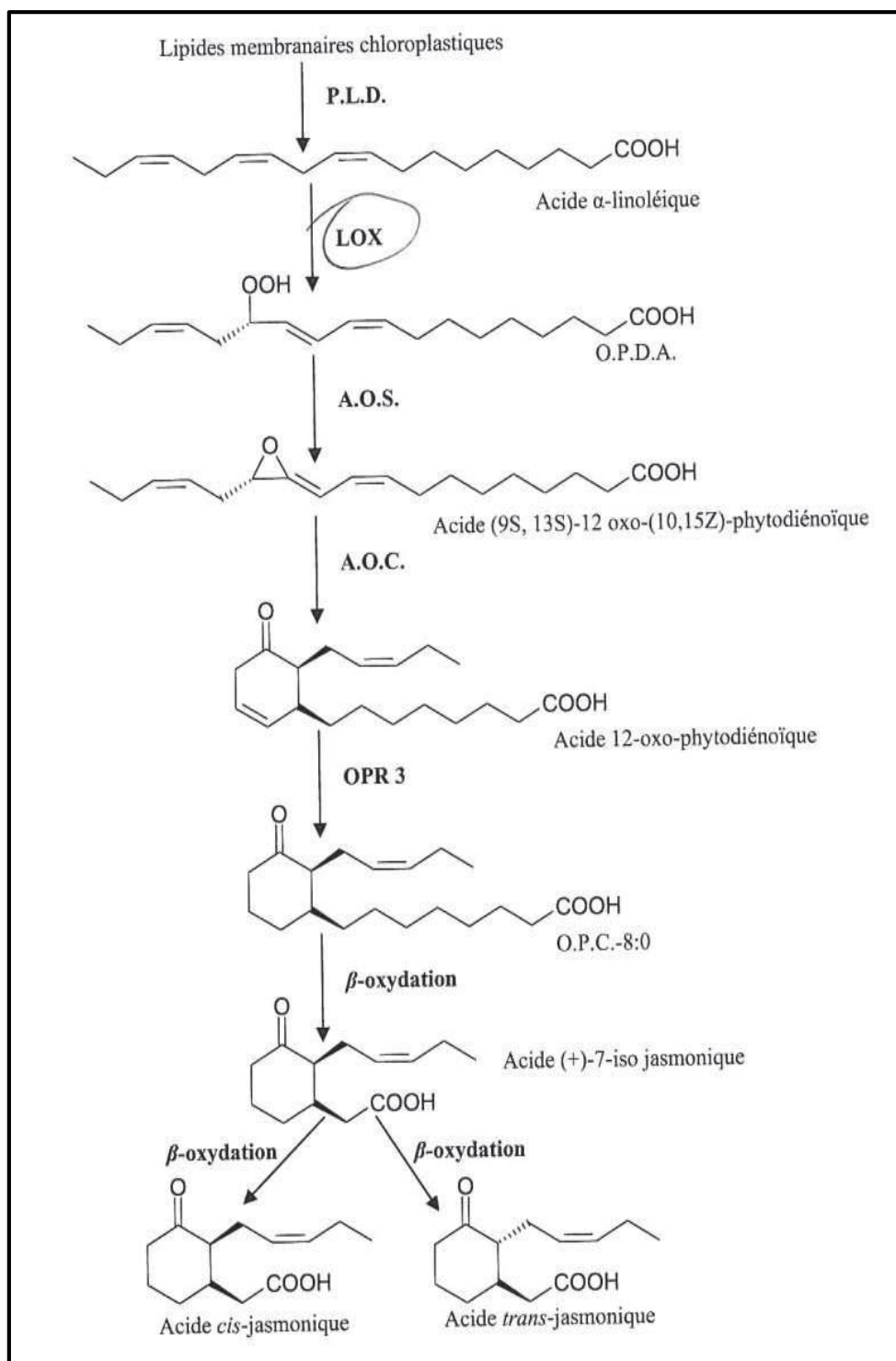


Figure 12. Voie de biosynthèse de l'acide jasmonique (Turner *et al.*, 2002).

A.O.C. : Allène Oxyde Cyclase ; A.O.S. : Allène Oxyde Synthase ; LOX : Lipoxygénase ; O.P.C.-8 :0 : acide 3-oxo-2-(2'(Z)-pentyl)- cyclopentane-1 octanoïde ; O.P.D.A acide 13-(S) hydroperoxyoctadecatrienoïque ; OPR 3 : O.P.D.A réductase ; P.L.D. Phospholipase D

II.3.4 L'acide jasmonique et son méthyle

Les jasmonates dérivent de l'acide linoléique et appartiennent à la famille des oxylipines, 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 (Turner *et al.*, 2002). Du fait, le méthyle jasmonate est impliqué dans l'expression de la résistance des plantes en tant que signal cellulaire afin d'induire l'expression des gènes de défense ou, dans certains cas, de réguler la mort cellulaire (La camera *et al.*, 2004). L'induction de certains gènes de défense est inhibée chez des plantes déficientes en méthyle jasmonate. Par ailleurs une application exogène de méthyle jasmonate sur le feuillage de plantes stimule la biosynthèse des phytoalexines (Tamogami *et al.*, 1997).→ (voir figure : 12)

II.4 Propriétés des SDN

Les principales propriétés des SDN sont :

- Les ingrédients actifs des SDN sont des substances entièrement biologiques ou des dérivés synthétiques de molécules biologiques ;
- Les SDN présentent l'avantage de conserver leur activité biologique sur une longue période grâce à une formulation appropriée : une formulation appropriée augmente la biodisponibilité des SDN, ce qui mène à conserver leurs activités biologiques pour une longue durée, et renforce leur niveau de résistance induits contre les pathogènes. Par exemple, la formulation de laminarine sulfatés à l'aide d'un adjuvant adhoc, permet d'augmenter sa biodisponibilité chez la vigne en facilitant sa pénétration dans les tissus foliaire, en préservant leurs activités biologique à long terme, et augmentant leur niveau de résistance induite contre le mildiou (Paris *et al.*, 2016) ;
- Les SDN sont capables de conférer aux plantes une résistance systémique et durable ;
- Les SDN n'exercent pas de phytotoxicité répertoriée et leur toxicité pour l'environnement est réduite, voire inexistante. De plus, ils sont biodégradables ;
- Les SDN exercent un effet potentiel sur la réduction des fréquences d'apparition de phénomènes de résistance ; l'emploi répété de pesticides conduit à l'apparition de bio-agresseurs hautement résistants. Appliqués sur une plante,

les SDN vont induire les étapes de détection et enclencher l'émission de cascades moléculaires d'alertes. En plus ils amorcent une activation plus rapide et intense lors d'une attaque ultérieure par potentialisation, permettant à la plante d'être plus performante aux agressions extérieures. Il est donc à constater que l'emploi des SDN constitue une méthode de protection plus durable que celle basée sur les pesticides. Il est toutefois indispensable d'anticiper l'impact sur le long terme de la résistance induite vis-à-vis de l'adaptation des populations de bio-agresseurs (Berthelot *et al.*, 2018).

- L'application des SDN est relativement simple et s'intègre parfaitement aux pratiques culturales ;
- Les SDN sont sécuritaires pour la santé humaine et animale (Benhamou et Rey, 2012).

II.5 Mode d'action des SDN

II.5.1 Molécules agissant au niveau de la reconnaissance de l'agent pathogène

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 :

A. Des composés protéiniques, saccharidiques et autres 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 et Brunner, 2002). Du fait, ces éliciteurs isolés de phyto-pathogènes sont produits de manière constitutive par le pathogène, car ils sont généralement essentiels à son bon fonctionnement (Jordan *et al.*, 2008). Citons comme exemple le chitosan, est un chitosaccharide obtenu par déacétylation de la chitine : proche de ce constituant de la paroi des champignons (Blanchard et Limache, 2005).

PAMP* : Durant l'interaction plante-microorganisme, les PAMPs sont considérés comme les premières molécules détectées par la plante. Ces derniers sont des motifs moléculaires conservés qui occupent des fonctions essentielles dans la survie et la valeur sélective des microorganismes (Jones et Dangl, 2006). Ils appartiennent à une large classe de molécules incluant des composés lipidiques, des glycolipides, des polysaccharides, ou des glyco-peptides et protéines (Jordan *et al.*, 2008). Toutefois

les structures des différentes classes de PAMPs sont hautement conservées par microorganisme à l'autre, il est très difficile pour les microorganismes de les modifier ou de les perdre, que le microbe soit pathogène ou non (Jones et Dangl, 2006).

B. Des composés extraits d'animaux, végétaux ou algues mimant les PAMP : On peut mimer l'agression d'un pathogène en appliquant des enzymes hydrolytiques sur la plante. Les cellulases produites par *Trichoderma harzianum* sont intéressantes et efficaces puisqu'elles induisent une réaction systémique dont les effets persistent une quinzaine de jours en serre sur melon, concombre, tomate et vigne. Dans le même ordre d'idée, des protéases issues d'extraits végétaux judicieusement choisis permettent de protéger le melon à 60 % contre *Fusarium oxysporum*, ainsi que contre l'oïdium (Blanchard et Limache, 2005).

II.5.2 Molécules intervenant dans la cascade des signaux

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. En général, ces SDN sont des molécules analogues de l'acide salicylique ou de l'acide jasmonique. Citons comme exemple, l'harpine agit au tout début de cette cascade, lors du déclenchement de la réaction hypersensible (Blanchard et Limache, 2005).

II.5.3 Molécules de potentialisation

Les SDN de cette famille sont nommés potentialisateurs. Ils ne déclenchent pas la production de molécules de défense après leur application et en absence de pathogène mais, en cas d'infection, c'est la totalité des réactions de défense qui s'exprime très rapidement et fortement (Trouvelot *et al.* 2006). Cette hyperactivation des défenses peut être provoquée par des pathogènes, des microorganismes bénéfiques comme les rhizobactéries ou les mycorrhizes, des substances biologiques ou synthétiques tel que l'AS, les lipopolysaccharides bactériens ou l'acide bêta-aminobutyrique (BABA). C'est par analogie avec un phénomène existant chez les macrophages que cette capacité accrue à mobiliser les réponses de la défense a été appelée « potentialisation » ou « priming ». (Cornath *et al.*, 2006). Hammiduzzman avec ses collaborateurs ont observé des réponses de protection chez la vigne après infection par l'oomycète *Plasmopara viticola*.

Alors l'analyse histochimique des feuilles de vigne infectées a permis de relier la résistance induite par le BABA au dépôt plus rapide et plus intense de callose qui bloque la pénétration de l'oomycète dans la plante. Cette résistance est basée sur la potentialisation de l'accumulation des transcrits des gènes de défense, uniquement après perception du pathogène (Hamiduzzaman *et al.*, 2005). D'autre part, la potentialisation tient également un rôle dans l'amélioration de la tolérance à des stress abiotiques tel que la sécheresse et la salinité. Lors d'un stress hydrique ou salin, des plantes prétraitées par le BABA flétrissent plus tardivement que les plantes non prétraitées. Cette tolérance est due à la fermeture plus rapide des stomates provoquée par une accumulation précoce de l'acide abscissique (Jakab *et al.*, 2005). Le phénomène du *priming* présente un énorme avantage en termes de coûts énergétiques pour la plante, puisque les réponses de défense ne sont exprimées que lorsqu'elles sont réellement exigées, en cas d'attaque par le pathogène (Van Hulten *et al.*, 2006).

II.6 Types des SDN

La stratégie de stimulation des défenses de plante revêt un intérêt particulier pour la protection de certaines cultures en tant qu'alternative ou complément aux traitements chimiques. Par l'application d'éliciteurs généraux ou spécifiques, organiques ou inorganiques, il est possible d'amplifier le niveau basal de défense de la plante. Ainsi grâce à l'immunité acquise, la plante opposera immédiatement, dès l'arrivée du pathogène, une résistance suffisante pour limiter, voire empêcher son développement. Divers éliciteurs sont connus comme étant susceptibles de stimuler les défenses de la plante (Lyon, 2007).

II.6.1 Eliciteurs d'origine biotique

Il existe une grande variété d'éliciteurs biotiques, d'origine animale, végétale, fongique ou bactérienne. Citons à titre d'exemple :

II.6.1.1 L'acide cholique

Acide biliaire également retrouvé dans les fèces des animaux et notamment dans les composts utilisés en tant que fertilisants, protège le riz (*Oryza sativa*) contre des attaques d'un champignon pathogène (*Magnaporthe griseae*) en induisant une réaction

hypersensible résultant de l'accumulation de protéines PR et de phytoalexines au site de l'infection (Koga *et al.*, 2006).

II.6.1.2 L'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. Les résultats ont démontré que le champignon avirulent (*Leptosphaeria biglobosa*) permet de diminuer significativement les symptômes causés sur les feuilles par l'espèce pathogène (*Leptosphaeria maculans*) sur le colza (*Brassica napus* L.) (Huang *et al.*, 2011).

II.6.1.3 Oligosaccharides

Pour protéger des pousses de millet (*Penisetum glaucum*), contre *Sclerospora graminicola*, Hindumathy *et al* (2006), appliquent un extrait saccharidique d'*Aspergillus niger* sur les graines qui induit une augmentation de l'activité peroxydasique (PR protéines), et un renforcement des parois végétales par accumulation de lignine et dépôt de callose.

II.6.1.4 Chitosan

Chitosaccharide obtenu par déacétylation de la chitine. Il est également présent dans la spécialité Elexa™ homologué par Glycogenesys Inc. Le chitosan a montré son efficacité dans de nombreux patho-systèmes protégeant ainsi la tomate, le tabac, le concombre et la vigne contre des champignons pathogènes (Iriti *et al.*, 2011). Les expérimentation au champ avec une formulation test à 2 % ont permis de révéler une efficacité de 40 % contre *Botrytis cinerea* (pourriture grise de la vigne) avec deux applications, avant et après l'attaque du pathogène (Amboraré *et al.*, 2004). Aussi les travaux de (Falcon-Rodriguez *et al.*, 2009) ont démontré l'efficacité du chitosan contre l'oïdium (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) de l'orge (*Hordeum vulgare*), ainsi que son activité antivirale sur le tabac (*Nicotiana tabacum*). La résistance induite des plantes par le chitosan est associée à l'accumulation de phytoalexines dans les tissus

végétaux traités, en raison de la stimulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, un effet typique de l'établissement de la résistance systémique acquise (Aziz *et al.*, 2007). Les travaux de (Benhamou et Picard, 2000) pour lutter contre la fusariose de la tomate ont porté sur la pourriture des racines et du collet de la tomate (*Solanum lycopersicum*) causée par *Fusarium oxysporum*, l'application du chitosan s'effectue par enrobage des racines ou vaporisation sur le feuillage. Ces travaux ont mené à des résultats très promoteurs : réduction significative des lésions racinaires causées par le champignon, et accumulation d'un matériel enrichi en composés phénoliques le long des parois des cellules de l'épiderme et du cortex racinaire et imprégnation des parois par la lignine (Benhamou et Picard, 2000).

II.6.1.5 Laminarine

Oligosaccharide (b, 1-3 glucane - Iodus 40®, homologué par la société Goëmar) ou son dérivé sulfaté (PS3), extraite de l'algue brune *Laminaria digitata*, induit une résistance de la vigne contre *P. viticola* et *B. cinerea* (Aziz *et al.*, 2003). 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). L'application d'un extrait préparé à partir d'une algue verte *Ulva armoricana* induit la protection de la plante *Medicago truncatula* (la luzerne tronquée), contre une infection fongique causée par *Colletotrichum trifolii*, associée à l'expression du gène marqueur de défense de type *PR10* (Cluzet *et al.*, 2004).

II.6.1.6 Protéines issues du genre Phytophthora

Les travaux de Brunner et son équipe, mené sur les peptides Pep13, qui sont des fragments de glycoprotéines issues du genre *Phytophthora*. Testés sur persil et pomme de terre, ont démontré que 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* infestants, un apport de Pep13 à une dose de 10 nano mole est suffisant pour induire l'accumulation de transcripts 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) (Brunner *et al.*, 2002).

II.6.1.7 Harpines

Les harpines sont de petites protéines acides, thermostables et riches en glycine, produites par des bactéries phytopathogènes comme *Erwinia amylovora* ou *Pseudomonas syringae* (Messenger®, homologué par la société Eden Biosciences) (Wei *et al.*, 1992). Préparation SDN à 3% de cette molécule, appliquée sur tomate, poivre, concombre, melon, fraise, laitue, agrumes et olives, induit une réponse complète de la plante dans les 3 à 5 jours après traitement, qui dure plusieurs semaines selon la culture (Blanchard et Limache, 2005). 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 (β -1,3-glucanase) (Buhot, 2003).

II.6.1.8 Extrait de fenugrec

Le Stifenia® est une poudre élaborée par broyage de la fraction « cotylédons + germe » des graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*), légumineuse originaire des pays méditerranéens. Ce nouveau produit naturel permet la protection des plantes contre certains agents pathogènes par le phénomène de potentialisation des réactions de défense (Martinez et Loison, 2006). Ce produit a été testé pour la première fois chez le patho-système palmier dattier-*Fusarium oxysporum*, agent causal de la maladie du bayoud. Les résultats obtenus montrent que le prétraitement des plantes par le produit Stifénia n'a pas induit systématiquement l'activation des peroxydases ni celle des polyphénoloxydases, deux enzymes fortement impliquées dans la résistance des plantes au bayoud, ce qui mène à conclure que le produit stifénia a également joué le rôle d'un éliciteur direct en induisant des réponses de défense bien avant la perception de l'agent pathogène (Abouraïcha *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'inoculation des racines du dattier par *Fusarium oxysporum* stimule rapidement les activités peroxydasiques chez les plantes prétraitées par la solution de Stifénia pour atteindre des valeurs quatre fois plus importantes que celles relevées chez les plantes prétraitées par le produit seul. Ces réponses de défense traduisent, une potentialisation et une mise en veille des jeunes plants du dattier (Abouraïcha *et al.*, 2010).

II.6.2 Eliciteurs d'origine synthétique

Les éliciteurs abiotiques sont des composés de nature minérale ou organique. Parmi les nombreux produits chimiques utilisés pour induire la résistance de la plante, figurent l'acide β amino butyrique (BABA), l'acide salicylique (AS) ou ses analogues fonctionnels comme l'acide 2,6 dichloro-isonicotinique (INA), l'acibenzolar-S-méthyl (ASM) ou benzothiadiazole (BTH) et l'acide jasmonique ou son analogue le méthyl jasmonate (Belhadj *et al.*, 2006) .

II.6.2.1 BABA (Acide β Amino-Butyrique)

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 et Bhargava, 2007). A titre de premier exemple, BABA a apporté des résultats concluants pour la protection des cultures de pommes de terre contre *Phytophthora infestans*, champignon causant le mildiou des feuilles et des tubercules. Alors 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). En effet l'acide β aminobutyrique (BABA), reconnu comme un inducteur de la résistance locale et systémique au niveau des feuilles de vigne contre *P. viticola*, Il induit également un dépôt de callose et de lignine dans les cellules, permettant de limiter l'infection d'agent pathogène comme le mildiou (Cohen *et al.*, 2010).

Chapitre II : Stimulateurs des défenses naturelles des plantes

Tableau 1. Exemples de plantes exprimant une résistance contre différents pathogènes après traitement par le BABA (Trouvelot *et al.*, 2006).

Plante	Protection contre
Arabette (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Hyaloperonospora parasitica</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Plectosphaerella cucumerina</i>
Chou-fleur (<i>Brassica oleracea</i>)	<i>Hyaloperonospora parasitica</i> , <i>Alternaria brassicicola</i>
Mais (<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> , Vim de la mosaïque du tabac
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Afeloidoune javanica</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp, <i>lecopersici</i> , <i>Botrytis cinerea</i>
Vigne (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Plasmopara viticola</i>

II.6.2.2 Acide salicylique et ses analogues

L'acide salicylique (AS) est un signal endogène pour l'activation de la résistance systémique induite (ISR) et la caractérisation de produits de synthèse capables de mimer son action a été réalisée. Ainsi, l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) et son ester méthylique (tous deux référencés sous le nom de l'INA) ont été les premiers composés de synthèse décrits comme activateurs de l'ISR, offrant ainsi un large spectre de résistance aux maladies (Conrath *et al.*, 2001). L'acide salicylique est peu utilisé en application exogène et les chercheurs lui préfèrent des formes analogues. En effet, AS n'est par exemple pas efficace pour éliciter les défenses des plantes face aux maladies racinaires car, lors d'un traitement avec AS, la quantité d'AS libre absorbée dans les racines est considérée comme trop faible pour avoir un éventuel effet sur les processus de défense, d'autant plus que l'AS se dirige préférentiellement vers les parties aériennes (Molinari et Loffredo, 2006).

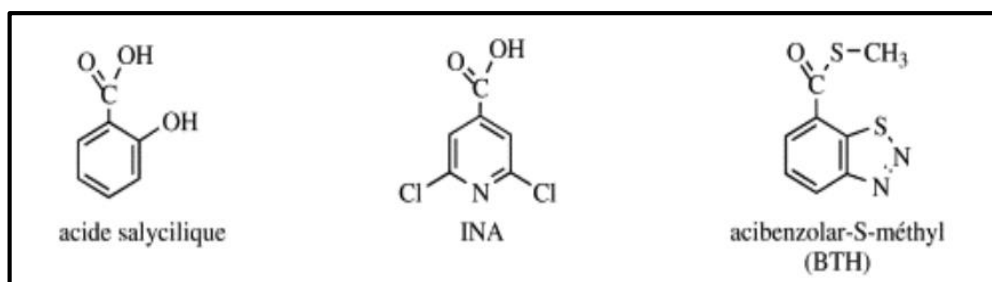


Figure 13. Formules de l'acide salicylique et de ses analogues SDN (Blanchard et Limache, 2005).

II.6.2.3 Acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA)

Il 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. Résultat, 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 résistance systémique acquise mais cette réponse est inhibée à la suite de l'inoculation avec les nématodes (Sanz-Alferez *et al.*, 2008).

II.6.2.4 Acibenzolar-S-méthyl (ASM)

L'acibenzolar-S-méthyl (ASM) appartient à la famille des benzothiadiazoles (BTH) et représente un autre analogue structural de l'acide salicylique (Belhadj *et al.*, 2006). L'ASM a porté une bonne efficacité contre les champignons pathogènes. En effet des essais menés par (Bubici *et al.*, 2006) ont eu lieu en Italie sur tomates 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 quel que 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. Alors 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). L'étude a montré que ce résultat est équivalent à ceux obtenus avec des fongicides chimiques (Bubici *et al.*, 2006).

II.6.3 Génie génétique

La connaissance des mécanismes de défense des plantes a aussi permis le développement de plantes transgéniques surexprimant des composants de défense situés en aval de la cascade de signalisation, comme une chitinase ou une β -1,3-glucanase. Les résultats ont été encourageants, les plantes se sont montrées efficaces contre plusieurs pathogènes en laboratoire, mais ils restent à approfondir : il faudrait faire exprimer fortement et simultanément toute une panoplie de gènes de défense pour mimer au mieux le système de défense (Klarzynski et Fritig, 2001).

II.7 Facteurs influençant l'efficacité des éliciteurs

Pratiquement, il arrive que l'efficacité des éliciteurs pourtant démontrée au laboratoire soit plus variable au champ. Du fait, les trois protagonistes « éliciteurs », « plante » et « agents pathogènes », seul conditionnent évidemment l'efficacité résultante, mais des facteurs plus globaux comme les conditions environnementales peuvent en plus moduler les relations liants ces trois premiers. Différents facteurs pouvant moduler l'efficacité des éliciteurs aux champs ont été cités dans la littérature (Walter *et al.*, 2013).

II.7.1 Facteurs liés à l'éliciteurs

L'efficacité des éliciteurs à protéger une plante contre une maladie dépend tout d'abord des doses employées. Par exemple : chitosane induit une protection de vigne contre *B. cinerea* à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mais des concentrations plus élevées jusqu'à 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ne permettent pas de réduire davantage les tailles des lésions (Aziz *et al.*, 2007). Par ailleurs, la formulation d'un éliciteur est essentielle, elle doit franchir la cuticule puis la paroi végétale. Par exemple, la formulation de la Stéfania à base de fenugrec permet d'augmenter sa biodisponibilité chez la vigne en facilitant sa pénétration dans les tissus foliaires, augmentant consécutivement le niveau de résistance induite contre l'oïdium d'après Martinez et Loison (2006). Aussi la fréquence de traitement peut être un élément clé pour l'efficacité d'un éliciteur. En effet des applications

hebdomadaires de BTH ont montré de meilleures protections contre *Xantomonas sp* sur tomate, comparativement à des applications bihebdomadaires (Huang *et al.*, 2012).

II.7.2 Facteurs liés à l'agent pathogène

L'influence de l'agent pathogène est également primordiale dans l'efficacité de l'éliciteur. Tout d'abord, pour une même plante hôte, un éliciteur donné protège le plus souvent contre un, voire deux agents pathogènes, mais rarement contre un large spectre de genre différents. Du fait des variations d'efficacités liées au degré d'agressivité des souches ont été constatées lors d'une étude réalisée sur 41 souches de *Botrytis cinerea* présentant différents niveaux d'agressivité, menée sur tomate, a révélé que l'efficacité de protection apportée par un agent de biocontrôle était autant plus marquée que la souche était peu agressive (Bardin *et al.*, 2013).

II.7.3 Facteurs liés à la plante

On rapporte également l'importance des états hydriques et/ou nutritionnels de la plante dans sa capacité à répondre à l'induction de ses défenses. En effet les travaux d'Aljabal *et al.*, (2015) ont montré que, sur des tomates en situation de déficience azotée ou hydrique, l'efficacité de protection contre *Botrytis cinerea* par différents éliciteurs est réduite.

II.7.4 Facteurs environnementaux

Chacun des facteurs que nous venons de citer sont eux-mêmes dépendants d'autres paramètres plus globaux, telles que les conditions environnementales. Ils peuvent agir sur les différents éléments de l'interaction de façon très complexe. Par exemple, l'humidité relative et la température peuvent créer des conditions favorables à la pénétration de molécules actives formulées dans les organes de la plante (Baur, 1999). D'autres paramètres, tels que la lumière (quantité, qualité, durée), le stress thermique (froid ou chaud), certaines caractéristiques des sols (salinité, métaux lourds, pH, ...), pourraient être potentiellement des facteurs influençant l'efficacité des éliciteurs, car ils sont déjà connus comme sources de stress avérées auxquelles les plantes doivent faire face (Pereira, 2016).

II.8 Quelques SDN disponible sur le marché

II.8.1 Messenger®

Le Messenger® est un produit dont la matière active est une protéine bactérienne, la harpine, qui est synthétisée à la suite de l'activité d'un cluster de gènes conservés, les gènes *hrp*, ils induisent des réactions d'hypersensibilités chez les plantes non hôtes, sans que l'on sache exactement par quel moyen (Ebel, 1998). Ce produit a été validé en 2000 et il est actuellement commercialisé par EDEN BIOSCIENCE aux États-Unis. Cette compagnie américaine a réussi à insérer les gènes *hrp* dans une souche affaiblie d'*Escherichia coli* afin de produire industriellement la harpine en fermenteur. 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 (Benhamou et Rey, 2012).

II.8.2 Iodus 40®

Le Iodus 40®, dont le principe actif est la laminarine, un polymère de 1,3-glucanes extrait de l'algue brune (*Laminaria digitata*), est le premier stimulant l'immunité végétale à avoir été commercialisé par Goëmar (France). Homologué pour lutter contre l'oïdium, le piétin-verse et la septoriose. Elle est utilisée telle quelle, sans modification chimique. Il s'agit d'une molécule naturelle qui est biodégradable, sans danger et très faiblement toxique (DL50 (oral, rat) > 2000 mg/kg) d'où l'absence de classement toxicologique et de phrase de risque pour Le Iodus 40® (Blanchard et Limache, 2005).

II.8.3 Stifénia®

La matière active du Stifénia® est un extrait de graines de fenugrec, une plante aussi appelée trigonelle ou sénégrain. Le Stifénia® est homologué en 2005 par la Société Occitane de Fabrications et de Technologies pour la lutte contre l'oïdium de la vigne. Commercialisé depuis 2006 en France par la société Soft. De plus, le traitement par du Stifénia® ne cause aucune phytotoxicité et ne montre a priori pas un profil susceptible de présenter des dangers pour l'environnement et la santé des consommateurs (Martinez et Loison, 2006). Sa biodégradabilité et les faibles doses auxquelles il est appliqué font que les risques de résidus dans le sol sont relativement

faibles. Ainsi, l'utilisation de cet éliciteur naturel s'inscrit parfaitement dans le cadre d'une agriculture raisonnée (Benhamou, 2009).

II.8.4 Elexa™

Le Elexa™ est une formulation liquide dont le principe actif est le chitosane à une concentration de 4 %. Cette formulation est commercialisée par GlycoGenesys Inc. (Boston, États-Unis). En effet, les travaux de Sharathchandra *et al.*, (2004) ont rapporté qu'Elexa™ a donné une bonne formulation commerciale pour la gestion de la maladie du mildiou et qu'elle présente également des effets de promotion de la croissance du millet perlé. De plus ils ont démontrés qu'un enrobage des graines avec Elexa™ confère un niveau acceptable de protection, alors qu'une pulvérisation foliaire, ou encore mieux une combinaison des deux traitements, réduit de façon significative l'incidence de la maladie (Sharathchandra *et al.*, 2004).

II.8.5 Milsana®

Le Milsana® est une formulation biologique dont la matière active est un extrait de la renouée de sakhaline (*Reynoutria sachalinensis* F. Schmidt). L'extrait de *R. sachalinensis* représente 5 % de la formulation. Deux composés, l'émodine et le physcion, ont été identifiés dans la matière active de la formulation. Ces composés sont des anthraquinones possédant une structure aromatique. 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). Alors, aux États Unis, KHH Bioscience a homologué Milsana® VP 1999 et le distribue en tant que bioprotecteur de plantes (Benhamou et Rey, 2012).

Tableau 2. Liste des SDN actuellement sur le marché (Benhamou, 2009).

Produit	Composition	Compagnie
Iodus 40® et Iodus™ 2céréales	Laminarine = β .1, 3-glucanes	Goëmar (France)
Elexa™	Chitosane = N-glucosamine	Glycogenesys Inc. (É.-U.)
Messenger®	Heroine = peptide produit par la bactérie <i>Erwinia amylovora</i>	Eden Biosciences
Stifinia®	Extraits de pines de fenugrec	Societe occitane de fabrication de technologies (SOFT) (France)
Milsana®	Entrails de <i>Reynoutria sacchalinensis</i>	KHH BioSci Inc. (E.-U.) Dr. Shaette (Allemagne)
Sill-MATRIX™	Silicate de potassium	PQ Corporation (É.-U.)
Huile de Neem (NeernAtar®, Soluneem®, et plusieurs autres)	Azadirachtine extraite des grains de <i>Azadirachta indica</i> (Nem)	Ultrateck (Canada) Product Lawn & Garden Inc. (É.-U.) et plusieurs autres sociétés dans le monde
Cirebrosides	Glymphingolipides extraits de la membrane de champignons	-
Brassinostéroïdes	Hormones végétales de type stéroïde	-

II.9 Intérêt d'utilisation des SDN dans la protection des plantes

Les SDN accordent une nouvelle voie dans le domaine de la protection des plantes. Il reste cependant à bien préciser leur intérêt pour l'agriculture, aussi bien sur les plans technique qu'environnemental. Enfin, nous verrons quelle place peut prendre ces nouveaux moyens de lutte dans l'agriculture contemporaine.

II.9.1 Intérêt technique

Les SDN induisent les réactions de défense de la plante, qui mobilise alors ses moyens propres. Or le plus souvent il s'agit d'une résistance systémique acquise, qui est efficace contre un large spectre d'agresseurs. C'est un confort pour l'agriculteur, en même temps qu'une économie du nombre de passages au champ par rapport à l'application de plusieurs spécialités ciblées. De plus, ce large spectre de résistance permet d'envisager une lutte contre les viroses et les phytoplasmoses contre lesquelles on ne possède actuellement aucun traitement (Lyon et Newton, 1997). Les SDN sont aussi souvent efficaces sur un grand nombre de cultures, ce qui peut sauver des cultures mineures pour lesquelles le nombre de produits phytosanitaires disponibles est quasi-nul. Parce qu'ils ont un mode d'action indirect, il semble impossible que les SDN entraînent des résistances (qui seraient en fait des résistances aux propres systèmes de défense de la plante) (Gullino *et al.*, 2000). L'utilisation de SDN en alternance avec des produits phytosanitaires classiques permettrait d'éviter ou de retarder l'apparition de résistances à ces produits et donc augmenterait leur durabilité. Or c'est là un enjeu majeur de la protection des plantes pour les années à venir (Lyon et Newton, 1997). Certaines expérimentations s'accordent pour montrer que l'association d'un fongicide et d'un SDN est significativement plus efficace que la simple juxtaposition des deux produits. Il y aurait un effet de synergie intéressant à exploiter, permettant de réduire encore plus le nombre de traitements fongicides grâce au gain d'efficacité (Benhamou et Rey, 2012).

II.9.2 Intérêt environnemental

Dans un contexte où les préoccupations environnementales sont de plus en plus présentes, l'agriculture raisonnée devrait permettre aux producteurs agricoles de s'engager dans une démarche de développement durable en assurant une production de qualité tout en intégrant des valeurs fondamentales parmi lesquelles se retrouvent le respect de l'environnement, la maîtrise des risques sanitaires et la sécurité au travail (Benhamou et Rey, 2012). Les SDN sont le plus souvent des analogues ou des dérivés de molécules naturelles, efficaces à très faible dose et avec un profil éco-toxicologique généralement bon (certains sont même exempts de classement toxicologique et éco-toxicologique, comme Iodus 40). Ce sont donc des molécules très respectueuses de l'environnement (Benhamou, 2009).

II.9.3 Place dans l'agriculture contemporaine

Il reste la question importante de la place que les SDN peuvent prendre dans l'agriculture contemporaine, notamment face à la lutte chimique « classique ». Nous pensons qu'il serait illusoire de vouloir remplacer l'un par l'autre, d'autant qu'une cohabitation semble bénéfique (effet de la synergie), que ce soit au sein d'un programme de lutte ou d'une formulation. Or il y a des cultures pour lesquelles le programme de lutte est très chargé (comme la vigne et ses 20 traitements fongicides par an) et où le remplacement de 2 ou 3 traitements par des SDN pourrait être envisagé (Blanchard et Limache, 2005). Autres exemples de travaux réalisés, démontrent 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 (Esnault *et al.*, 2005). 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). Enfin, les SDN ont un rôle important à jouer dans les programmes de lutte intégrée, ceux-là même qui tendent à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires classiques, notamment en leur apportant une nouvelle approche, un complément d'efficacité et une plus grande flexibilité (Lyon et Newton, 1997).

II.10 Avantages et inconvénients des SDN

Dans le cadre des programmes de réduction des risques liés aux pesticides, et afin de limiter les impacts délétères des produits phytosanitaires et engrais chimiques

sur l'environnement, la possibilité d'avoir accès à des SDN suscite un intérêt grandissant au sein des fédérations de producteurs horticoles et agricoles (Leroux *et al.*, 2002).

II.10.1 Avantages des SDN

Ces produits d'origine naturelle (Stifénia®, Milsana®, Iodus 40®, Elexa™ et Messenger®) ont comme matière active des molécules simples qui sont isolées à partir de certaines plantes (*Trigonella foenum-graecum*, *Reynoutria sachalinensis*) ou d'algues (*Laminaria digitata*), ou encore extraites de crustacés (chitosane) ou de microorganismes (harpine, cérébrosides). En vertu de leur origine biologique, ces produits ne montrent pas, a priori, un profil susceptible de présenter des dangers pour l'environnement et pour la santé des consommateurs (Benhamou et Rey, 2012) :

- Au plan écotoxicologique, les effets semblent peu préoccupants, même si cet aspect doit encore être vérifié. Par ailleurs, leur biodégradabilité et les très faibles doses auxquelles ils sont appliqués font que les risques de résidus dans le sol sont relativement faibles (Benhamou et Rey, 2012) ;
- En vertu de leur mode d'action indirect sur la plante et non sur l'agent pathogène et des mécanismes nombreux et variés mis en place par le végétal, la probabilité que les SDN puissent induire rapidement un contournement de résistance de la part de l'agent pathogène est extrêmement faible (Benhamou et Rey, 2012) ;
- Les SDN peuvent s'inscrire en tant qu'agents complémentaires de la lutte chimique et peuvent jouer un rôle stratégique dans le cadre d'une approche d'anti-résistance aux fongicides, aussi il est possible de les utiliser en synergie avec des fongicides conventionnels (stratégie employée avec le Iodus 40®), ce qui permettrait de réduire au moins de moitié les doses de fongicides utilisées (Benhamou et Rey, 2012) ;
- Concernant l'accumulation de phytoalexines chez les plantes élicitées, Ebehardt et al., 2000 s'accordent à dire qu'elle serait plutôt bénéfique pour le consommateur. En effet, plusieurs composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, présentent des vertus thérapeutiques reconnues telles des activités anticancéreuses, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et/ou cardio-protectrices. Donc, les fruits et légumes issus de cultures traitées avec

des SDN seraient un peu plus riches en composés phénoliques et présenteraient une plus-value au plan diététique (Ebehardt *et al.*, 2000).

II.10.2 Inconvénients des SDN

Parmi les principaux inconvénients liés à l'utilisation des SDN, on trouve :

- la variabilité en termes de performance est certainement le facteur le plus préoccupant chez les SDN. Paramètres incluent la détermination précise des doses optimales de substances actives à utiliser, moments d'application, lesquels dépendent du stade physiologique de la plante. Viennent ensuite le temps requis pour que la résistance s'exprime, et enfin des critères épidémiologiques du parasite. Alors que pour les produits chimiques, ces paramètres sont bien maîtrisés ce qui leurs octroient une grande efficacité et longévité.
- le coût énergétique lié à l'induction de résistance qui, éventuellement, pourrait se traduire par une légère baisse de rendement (Benhamou et Rey, 2012).
- le potentiel allergène de certaines molécules de défense comme les protéines PR10, selon Ebner *et al.*, (2001), un traitement des cultures avec des SDN se répercute potentiellement sur la santé humaine. En effet, la stimulation du système immunitaire des plantes provoque l'activation d'une série de réactions biochimiques qui aboutissent à la synthèse de nouvelles molécules organiques, dont notamment des protéines PR10 proches à des ribonucléases, qui possèdent un pouvoir allergène puissant.

Chapitre III :

Matériel et méthodes

III. Matériel et méthodes

III.1 Objectifs de ce travail

L'utilisation des SDN s'avère une méthode alternative et/ou complémentaire intéressante à explorer en termes d'efficacité et de comportement sur la plante. Selon (Pajot, 2005) 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, dose efficace, coût énergétique pour la plante, et délai de mise en place de la résistance.

La stimulation des défenses des plantes en conditions de laboratoire permet de limiter le développement des bioagresseurs. Toutefois, l'application de cette méthode *in natura* semble plus délicate, et conduit généralement à des efficacités variables, très dépendantes de la génétique de la plante, des conditions environnementales et de la pression parasitaire (Dufour, 2011).

Face à ce constat, qu'il paraît important de comprendre les mécanismes mis en place dans la plante, de posséder des outils ou des marqueurs qui nous renseignent sur le statut de résistance de la plante pour évaluer l'efficacité de ces stimulateurs et mieux connaître leur potentiel de protection dans le cadre de nouvelles méthodes de lutte (Dufour, 2011).

Les méthodes d'évaluation des efficacités se situent à plusieurs niveaux :

- **Au niveau biologique** (inhibition de la croissance du pathogène) avec des tests d'efficacité selon deux méthodes standardisées (*in vitro* et *in vivo*).
- **Au niveau moléculaire** en suivant l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de défense par des analyses de PCR quantitative en temps réel.
- **Au niveau biochimique** soit par :
 - Mesure de l'activité enzymatique ; le dosage de certains enzymes marqueurs par spectrophotométrie permettent de mettre en évidence l'existence d'une réaction de défense suite à l'élicitation, plus l'activité d'une enzyme donnée est élevée, plus la réaction de la plante est jugée comme importante.
 - Quantification des phytoalexines produites par analyses chromatographiques liquide à haute performance (HPLC).
 - Mesure de la teneur en composés organiques volatils (VOCs) à action inhibitrice par chromatographie gazeuse (GC) (Berthelot *et al.*, 2018).

Nous basons dans ce troisième chapitre sur quelques expériences effectuées dans des conditions contrôlées, qui élucident l'évaluation d'efficacité des SDN par différentes méthodes d'analyses. Les protocoles expérimentaux sont pris à travers des travaux publiés par certains chercheurs.

La conduite des essais est motivée par ces objectifs ;

- Mise en évidence d'efficacité des SDN sous effet de l'agent pathogène
- Dosage de quelques enzymes marqueurs par spectrophotométrie.
- L'augmentation de la teneur en composés organiques volatils (VOCs), permet de les mesurer par chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).
- Identification des composés phénoliques par HPLC, après élicitation de la plante.

III.2 Enzymes marqueurs susceptibles d'être étudiés lors de dosage des activités enzymatiques

La reconnaissance de l'éliciteur occasionne un grand nombre de modifications physiologiques dans la plante. Beaucoup d'enzymes voient alors leur activité biologique augmentée lors de la résistance systémique acquise (SAR). La mesure de l'activité biologique de ces enzymes permet donc de mettre en évidence l'existence d'une réaction de défense suite à l'élicitation (plus l'activité d'une enzyme donnée est élevée, plus la réaction de la plante est jugée comme importante).

III.2.1 LOX (lipoxygénase)

LOX est responsable de la production d'acide jasmonique et d'aldéhyde. Elle est capable de peroxyder les lipides membranaires pour en changer leurs structures, et induit la biosynthèse des protéines de défense. (Porta et Rocha-Sosa, 2002). En effet, les lipoxygénases sont une classe d'enzymes qui transforment les acides linoléiques (18 : 2) ou linoléiques (18 : 3) en aldéhydes volatils, qui sont impliqués dans les défenses des plantes contre les attaques de pathogènes (Zeringue, 1992). LOX est impliquée dans les mécanismes de défense des plantes, elles rentrent dans les réactions d'hypersensibilité (HR), et son activité est augmentée suite à l'application d'éliciteur phosphate de potassium (KH_2PO_4) sur feuilles de l'orge (Mitchell et Walters, 2004).

III.2.2 PAL (phénylalanine ammonia-lyase)

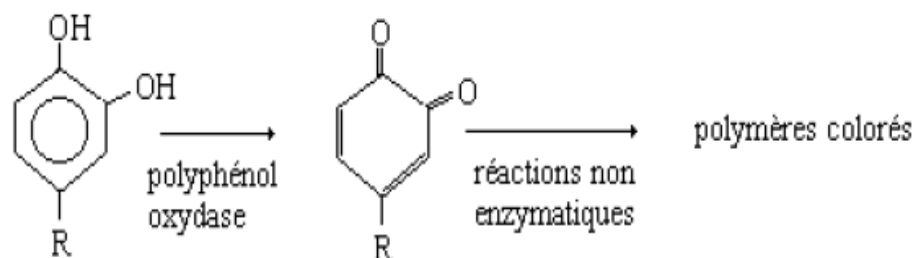
La PAL agit dans les premières étapes de la synthèse des produits phytochimiques (les phénylpropanoïdes). Elle permet la formation de l'acide cinnamique à partir de la phénylalanine selon la formule suivante :



La PAL est donc une enzyme responsable de la biosynthèse de nombreux composés végétaux tels que les monomères de lignine et de certaines classes de phytoalexines. Elle peut donc intervenir dans le renforcement des parois cellulaires, dans la destruction du pathogène par la synthèse de phytoalexines, mais aussi dans la transmission de signaux puisqu'elle participe à la synthèse d'acide salicylique (El Ghaouth *et al.*, 2002). En effet, des publications montrant une augmentation de son activité aussi bien après élicitation par l'acide salicylique (Terry et Joyce, 2004).

III.2.3 PPOX (polyphénoloxydase)

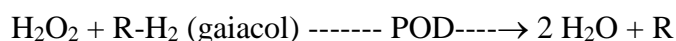
Ces enzymes sont responsables du brunissement enzymatique qui transforme les composés phénoliques en produits quinoniques (fortement antimicrobiens) précurseurs de mélanines colorées selon la formule suivante :



L'acide chlorogénique et le catéchol retrouvés dans les tissus végétaux sont des substrats de la PPOX (Avallone *et al.*, 2003). Des études montrent une augmentation de l'activité des PPOX sur récoltes de fruits de pêches, traités par l'éliciteur Benzothiadiazole (BTH) pour empêcher la croissance du champignon *Penicillium expansum* (Liu *et al.*, 2005).

III.2.4 POD (peroxydases)

Les POD ont un rôle clé dans la défense de la plante puisqu'elles décomposent les peroxydes (dérivés toxiques de l'oxygène) selon la formule suivante :



Les POD sont ainsi impliquées dans la résistance des plantes aux agents pathogènes en protégeant les cellules végétales des dommages des formes actives de l'oxygène (kvaratskhelia *et al.*, 1997).

Ces enzymes ont également un rôle dans la réponse de résistance des plantes. On leur connaît un rôle dans la synthèse de la subérine, dans les parois cellulaires de la plante pour former une barrière physique à la pénétration de l'agent pathogène (Mohan *et al.* 1990). En effet, les peroxydases sont capables de convertir des composés phénoliques en composés antimicrobiens (kobayashi *et al.*, 1994)

III.2.5 APX (ascorbate peroxydase)

L'ascorbate peroxydase convertit H_2O_2 en H_2O et O_2 . L'APX détoxifie les peroxydes à l'aide d'ascorbate d'après la formule suivante :



III.2.6 CAT (catalases)

La CAT catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène selon la formule suivante : $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$

Cette enzyme permet à la cellule de se protéger des ROS toxiques pour les cellules végétales (Schoener et Krause, 1990).

III.2.7 SOD (superoxyde dismutase)

SOD est une enzyme anti oxydante puissante. Elle catalyse la conversion d' O_2 en O_2^- et H_2O_2 selon la formule suivante : $O_2 \rightarrow O_2^- \xrightarrow{SOD} H_2O_2$

Cette enzyme permet à la cellule de se protéger des formes actives d'oxygène toxiques pour les cellules végétales (Beauchamp et Fridovich, 1971).

III.2.8 GST (glutathion S-transférase)

GST détoxifie les radicaux libres et catalyse l'attaque nucléophile du groupement thiol du tripeptide GSH selon la formule suivante : (Habig *et al.*, 1974)



GSH : glutathion réduit, CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzène

III.2.9 Chitinase

La chitinase est l'une des protéines PR qui ont des activités antimicrobiennes bien décrites contre différents pathogènes (Van Loon et Van Strien, 1999). Les chitinases constituent un groupe d'enzymes vaste et diversifié, ils sont également l'une des protéines importantes liées à la pathogénèse des plantes. Du fait, sur la base de leurs activités hydrolytiques, elles participent à la dégradation de la chitine par le clivage de la liaison glycosidique entre les positions carboxyliques C1 et C4 de deux monomères N-acétyl-D glucosamine de la chitine (Jalil *et al.*, 2015). Les chitinases pourraient également jouer un rôle important dans l'amplification des réactions de défense par la libération de la chitine des parois cellulaires des pathogènes (Kurosaki *et al.*, 1988).

III.3 Exemples des méthodes d'évaluation des efficacités des SDN à différents niveaux biologiques et biochimiques

III.3.1 Niveaux biologiques

Le chitosan a été évalué sur le développement de la pourriture grise sur la vigne par une équipe de chercheurs champenois en laboratoire. 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. Dans un deuxième temps, Le traitement des feuilles de vigne par le chitosan a conduit à une induction marquée par les activités lipoxgénase (LOX), phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et chitinase.

Les résultats aboutis par ces trois marqueurs soulignent la puissance du chitosan dans l'induction de certaines réponses de défense dans les feuilles de vigne, ce qui pourrait améliorer la résistance à la pourriture grise.

Protocole expérimental adopté par Trotel-Aziz *et al.*, 2006, pour mesurer le diamètre moyen des lésions formées pendant l'infection est le suivant :

III.3.1.1 Test d'efficacité du chitosan

Des feuilles de vigne excisées à partir de plantules, âgées de 10 semaines, incubées dans un tampon MES ; nom courant de l'acide 2-N-morpholinoéthano-sulfonique (2 mM, pH 5,9) contenant 0,5 mM de CaCl₂ (chlorure de calcium) et 0,5 mM de K₂SO₄ (sulfate de potassium). Complété par différentes concentrations de chitosan de (0, 75, 150, 200, 250 et 300 mg l⁻¹). Après une période de 20 heures,

les feuilles ont été épongées, séchées, et placées dans des boîtes de Pétri. La face du côté adaxiale de la feuille, humidifiée le papier absorbant. Une plaie par piqûre d'aiguille est appliquée sur chaque feuille, et les blessures fraîches seront recouvertes avec 5 µl gouttes de la suspension conidienne ($2,5 \times 10^5$ conidies ml⁻¹). Le développement de la maladie est mesuré par le diamètre moyen des lésions formées pendant l'infection des feuilles de vigne par *Botrytis cinerea*. Les mesures ont été arrêtées après 7 jours lorsque les feuilles témoins étaient fortement infectées (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

III.3.1.2 Mesure de l'activité antifongique

Afin de mesurer l'effet direct du chitosan sur le développement du champignon, des essais *in vitro* ont été effectués sur des plaques avec chitosan dissous dans la PDA (gélose dextrosée à la pomme de terre) à différentes concentrations (0, 75, 150, 200, 250, 300 mg l⁻¹). Les plaques de PDA ont été inoculées au centre avec 10 µl de la suspension conidienne de *Botrytis cinerea*, et placées à 22° C. La croissance fongique est mesurée quotidiennement pendant 5 jours et exprimée en diamètre moyen (mm) (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

III.3.2 Niveaux biochimiques

III.3.2.1 Mesures des activités enzymatiques

Protocole expérimental adopté par Trotel-Aziz *et al.* 2006, pour mesurer les activités enzymatiques est le suivant :

III.3.2.1.1 Traitement des feuilles de vigne

Des feuilles de vigne de 10 semaines détachées de plantules, ont été incubées dans la chambre de culture sur tampon MES contenant différentes concentrations de chitosan de 0 jusqu'à 300 mg l⁻¹. Après traitement, les feuilles ont été épongées, séchées et fixées dans l'azote liquide, et stockées à -80°C avant d'être analysées (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

III.3.2.1.2 Dosage des activités enzymatiques

Les extraits enzymatiques étant très fragiles (perte d'activité), les mesures d'activité enzymatique ont dû être faites directement après l'extraction (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

A) Dosage de l'activité de la Lipoxygénase (LOX)

Feuilles de vigne congelées (250 mg de leur poids frais), broyées au pilon et au mortier à 4°C avec de la polyvinylpyrrolidone (PVPP, 1% p/p) et 1 ml tampon phosphate de sodium Na₃ PO₄ (50 mM, pH 6,5) contenant un détergent de synthèse, comme le Triton X-100 (0,25% v/v) et du fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF, 1 mM). L'homogénat est centrifugé à 20 000 tours pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est conservé sur la glace et utilisé pour l'extraction enzymatique. L'activité Lox est déterminée selon la méthode d'Axelrod *et al.*, (1981) utilisant l'acide linoléique comme substrat (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

Le dosage de l'activité (LOX) est préparé par addition de 25 µl de l'extrait enzymatique à un mélange contenant 100 µl d'acide linoléique (10 mM) et 0,875 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 6,0). La réaction est conduite à 25°C, et l'activité LOX est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 234 nm pendant 1, 2.5 et 5 min, utilisant le spectrophotomètre UV-visible simple faisceau pour la mesure. La même procédure est utilisée pour la réaction à blanc dans laquelle le tampon phosphate (pH 6,5) est remplacé par l'extrait de feuille. Les hydroperoxydes formés au cours de la réaction enzymatique ont été quantifiés à l'aide d'un coefficient d'extinction molaire de 25.000 M⁻¹ cm⁻¹ (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

B) Dosage de l'activité de la Phénylalanine ammonia-lyase (PAL)

Feuilles de vigne congelées (250 mg de leur poids frais) broyées à 4°C, avec de la polyvinylpyrrolidone (PVPP, 1% p/p) et 1 ml tampon phosphate de potassium KOH (100 mM, pH 8,0) contenant du β mercaptoéthanol (1,4 mM). L'homogénat est centrifugé à 15 000 tours pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant résultant est utilisé comme extrait enzymatique brut (Trotel-Aziz *et al.* 2006).

L'activité PAL est déterminée selon la méthode Tanaka *et al.* (1974) légèrement modifiée. Le dosage de PAL est préparé par l'ajout de 0,45 ml de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8,8) et 0,2 ml de phénylalanine (40 mM) à 0,15 ml de l'extrait enzymatique. Le mélange est incubé pendant 10, 20 et 30 min à 37°C, et la réaction a été stoppée par l'ajout de 0,2 ml d'acide trichloracétique (TCA, 25%). Le mélange de dosage est centrifugé à 10 000 tours pendant 15 min à 4°C. L'absorbance du surnageant est mesurée à 280 nm par spectrophotomètre UV-visible simple faisceau. Les acides

cinnamiques formés pendant la réaction enzymatique ont été quantifiés à l'aide d'un coefficient d'extinction molaire de $17 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

C) Dosage de l'activité Chitinase

Feuilles de vigne congelées (250 mg de leur poids frais) broyées à 4°C , avec de la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP, 1% p/p), plus un tampon d'acétate de sodium $\text{C}_2\text{H}_3 \text{NaO}_2$ (50 mM, pH 5.0) contenant le Dithiothréitol (DTT, 1mM) et du fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF, 0.2 % p/v). Le mélange est ensuite centrifugé à 9000 tours pendant 5 min à 4°C . Le surnageant résultant contenant l'extrait enzymatique, il serait dilué à 1/10 lors du dosage de la chitinase (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

L'activité chitinase est déterminée selon la méthode décrite par Byrne *et al.*, (2001) en utilisant le CarboxyMethyl-chitin-Remazol Brilliant Violet 5R comme substrat. 50 μl de l'extrait dilué est incubé à 37°C dans un microtube Eppendorf contenant 0,1 ml de CM-chitine-RBV, 0.15 ml d'eau distillée et 0.1 ml de tampon acétate de sodium (200 mM, pH 5.0) pendant 0, 1, 2.5 et 5 min, et la réaction enzymatique est stoppée par l'addition de 0.4 ml de (HCl, 0.3 M). Ensuite, les microtubes seront refroidis sur glace durant 10 min avant d'être centrifugés à 9000 tours pendant 10 min à 4°C . L'absorbance du surnageant est mesurée à 550 nm par spectrophotomètre UV-visible simple faisceau (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

III.3.2.2 Identification des composés organiques volatils à action inhibitrice par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Une équipe de chercheurs chinois, He et ses collaborateurs (2006), ont travaillé sur l'utilisation d'un oligosaccharide issu de bardane (*Arctium lappa*) pour éliciter les défenses naturelles de la tomate face au botrytis. 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.

Ce phénomène est appuyé par deux méthodes d'analyses biochimiques : de fortes activités enzymatiques enregistrées entre 48 et 96 h après application de l'extrait, en utilisant le dosage des enzymes par spectrophotométrie. Suivi d'une forte

augmentation de la teneur en composés volatils à action inhibitrice constatée 5 jours après inoculation, analysée par GC/MS.

Protocole expérimental adopté par He *et al.*, (2006) est le suivant :

III.3.2.2.1 Traitement des feuilles avec l'oligosaccharide de bardane

Les feuilles ont été pulvérisées avec une concentration de 0,6 % d'oligosaccharide de bardane, et conservées à 18-25 °C avec une humidité relative de 70-80 %. Les feuilles pulvérisées avec de l'eau distillée stérile ont servi de témoins. Les tissus foliaires ont été collectés immédiatement et stockés à -80 °C jusqu'à l'analyse (He *et al.*, 2006).

III.3.2.2.2 Collecte des composés organiques volatils (VOCs)

Des échantillons ont été prélevés pour analyse 24, 72, 120, 168 et 216 heures après traitement. À l'aide d'un pilon réfrigéré, 5g des feuilles ont été soumises au cryobroyage, La boue végétale obtenue est rapidement transférée dans un appareil Purge and Trap de 250ml. Ensuite, 1.0 ml d'eau distillée et 10 µl de camphre (considéré comme étalon interne) ont été ajoutés à la mixture (He *et al.* 2006).

Les (VOCs) sont piégés dans un tube de verre de 70×90 mm de diamètre, contenant 700 mg de la résine absorbante G.D.X-101. Avec un flux d'azote gazeux de 200 à 250 mL/min à 52 °C pendant 3heures. Le tube piégé est séché à température ambiante par l'azote, avec le même débit pendant 1 heure. Les (VOCs) piégés sont élués trois fois, avec 5 mL de chlorure de méthylène et 0.5 mL de l'azote pour un débit de 100 mL/min. Un échantillon de 1µL est soumis à une analyse par GC/MS ; chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (He *et al.*, 2006).

III.3.2.2.3 Chromatogramme des composés organiques volatils (VOCs) dans les feuilles de *Lycopersicon esculentum* Mill après traitement avec l'oligosaccharide de bardane

Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse (CG/SM) représentent, un total de 12 constituants détectés dans les feuilles des plantes, et des constituants quantitativement différents mais qualitativement similaire sont été détectés dans les feuilles traitées (He *et al.*, 2006).

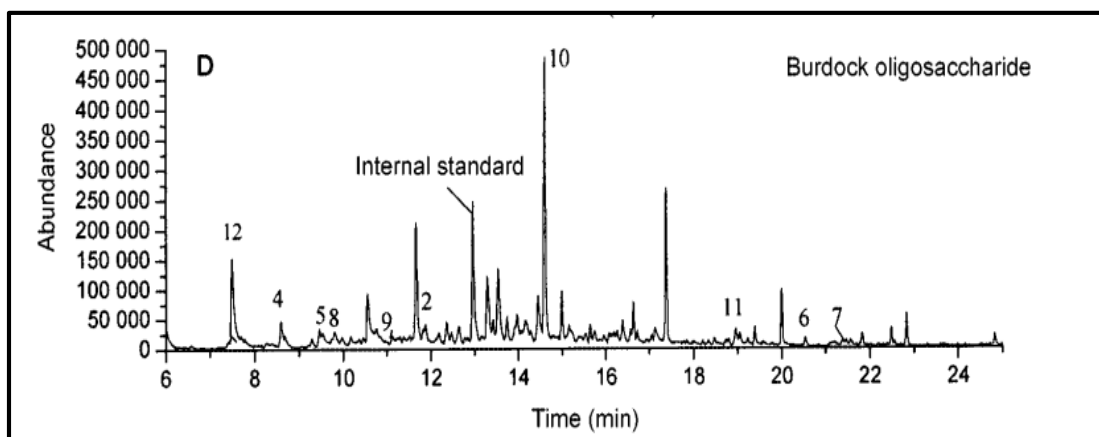


Figure 14. Chromatogramme des composés organiques volatils (VOCs)

1, (*E*)-2-hexenal; 2, nonenal; 4, (+)-2-carene; 5, β -phellandrene; 6, β -carophyllene; 7, α -caryophyllene; 8, benzylalcohol; 9, guaiacol; 10, methyl salicylate; 11, eugenol; 12, 5-ethyl-2(5H)-furanone.

En effet, une augmentation de la quantité des VOCs totaux a été détectée dans les feuilles traitées après 120 heures atteignant 1,74 fois celle du témoin, ainsi les dérivés d'acides gras et les composés aromatiques ont augmenté de 89 % et 48 %, respectivement. En outre, Le (*E*)-2-hexenal était le constituant le plus abondant, représentant 38,5 % du total des VOCs. Ce composé a augmenté de 92 % après traitement, ainsi le salicylate de méthyle, un important signal aérien, a été multiplié deux fois plus que le témoin (He *et al.*, 2006).

L'étude a démontré que ces fortes augmentations en composés volatils à action inhibitrice contre *Botrytis cinera*, produite par la plante *Lycopersicon esculentum* Mill fonctionnent comme des signaux, pour activer les gènes de défense et qui se traduit finalement en activité antimicrobienne (He *et al.*, 2006).

Sur la base de ces résultats, ces chercheurs ont conclu que l'oligosaccharide de bardane peut agir comme un éliciteur puissant pour la résistance systémique acquise chez les plantes (He *et al.* 2006).

III.3.2.3 Détermination des acides phénoliques par chromatographie liquide à haute performance HPLC

Hachoud avec ces collaborateurs (2019) ont stimulé les réactions de défense de deux variétés de pomme de terre (Agata = pomme de terre jaune, Red Pontiac = pomme de terre rouge), contre le *Pectobacterium* sp, par 03 éliciteurs : le méthyl de jasmonate, l'acide salicylique, et le chitosan. L'effet de ces composés a été testé en les ajoutant à une solution d'arrosage 2 jours avant d'inoculer les deux cultivars de *Solanum tuberosum* (pomme de terre), avec la souche virulente de *Pectobacterium carotovorum*, (Pc-5890), et la souche moins virulente de *Pectobacterium atrosepticum*, (Pa-5889). La croissance et la production de plusieurs composés phénoliques de défense ont été déterminées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ; dans des plantes traitées par les éliciteurs et inoculer par les deux formes d'agents pathogènes.

Le protocole expérimental adopté par Hachoud et ces collaborateurs (2019), pour l'analyse des composés phénoliques est le suivant :

III.3.2.3.1 Conception expérimentale

Des plantules âgées de 30 jours et de taille similaire poussant dans des pots de vermiculite et de sable ont été arrosées avec une solution nutritive de Ben Zioni contenant 100 μ M de Méthyle de jasmonate, ou de Chitosan, ou de l'acide salicylique, ou sans aucun de ces produits chimiques, qui ont servi comme témoin. Deux jours plus tard, le tiers supérieur des feuilles traitées et non traitées ont été inoculé avec des gouttes de 100 μ l d'une solution bactérienne (Pc-5890 ou Pa-5889). Six plantes de chaque variété de pomme de terre (Agata et Red Pontiac) ont été échantillonnées pour chaque traitement. Les plantes ont été récoltées 2 jours après l'élicitation (T2) et 3 jours après l'inoculation, ce qui fait 5 jours de culture (T5). Les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide et stockés immédiatement à - 80 °C, utilisées pour toutes déterminations chimiques (Hachoud *et al.*, 2019).

III.3.2.3.2 Extraction et analyse par HPLC

Les échantillons de tissus végétaux ont été lyophilisés, broyés en une poudre fine à l'aide d'un lyser de tissus, puis 40 à 60 mg de l'échantillon placés dans un tube Eppendorf de 2 ml, avec 1 ml de solvant d'extraction (solution à 80 % de méthanol). Les tubes bouchés ont été immergés dans un bain-marie à 40 °C pendant 45 minutes,

et l'opération est répétée deux fois. Les deux extraits méthanoliques ont été mélangés. Après agitation vigoureuse, les tubes seront refroidis et centrifugés à 7600 tours pendant 5 min. Le volume final du surnageant clair est porté à 1 ml, utilisé pour l'analyse individuelle des acides phénoliques. De l'hexane est ajouté au surnageant des échantillons extractés au méthanol, pour éliminer les lipides et autres composés interférents, et la phase méthanolique est utilisée pour l'analyse HPLC (Hachoud *et al.*, 2019).

L'infection par la souche Pc-5890 avait un effet plus néfaste sur les cultivars de pomme de terre que la souche Pa-5889, notamment en ce qui concerne la croissance des plantes. En effet, L'accumulation des composés phénoliques étudiés dans les deux cultivars de pomme de terre est significativement remarquables, lorsque le milieu était supplémenté avec des hormones liées au stress tel que : l'acide salicylique, le jasmonate de méthyle, et de l'éliciteur Chitosan. En revanche, la production de phénol a diminué dans les plantes non traitées après l'inoculation avec les deux souches de *Pectobacterium*. Du fait, Les niveaux les plus élevés de l'acide chlorogénique (CGA) ont été trouvés chez la variété Red Pontiac, alors que l'accumulation de l'acide paracoumarique (p-COM), l'acide caféique(CAF) et l'acide férulique (FRU) était plus élevée chez la variété Agata (Hachoud *et al.*, 2019).

L'amélioration de la croissance et de la santé des plantes prétraitées après l'infection, suggère que les réponses de défense des plantes de pomme de terre peuvent être efficacement augmentées par un traitement avec des inducteurs de la biosynthèse et de l'accumulation phénolique. Après activation de la voie de l'acide shikimique, la formation de phénylpropanoïdes et la voie de l'acide benzoïque.

Parmi les composés étudiés, l'acide salicylique a été le plus efficace en termes d'induction phénolique. Les données obtenues suggèrent que l'acide salicylique joue un rôle clé dans la défense des plantes de pomme de terre contre les pathogènes *Pectobacterium*, sans interférer dans la croissance de la plante (Hachoud *et al.*, 2019).

Conclusion

Conclusion

Les SDN représentent une solution alternative intéressante. Ces derniers trouvent parfaitement leur place dans la mouvance actuelle, car ils sont dotés d'une bonne image de marque par les firmes commerciales qui les désignent sous le vocable de « vaccins des plantes » ou même de « révolution de la chimie verte ».

Malgré les nombreux avantages associés à l'utilisation des SDN ; effet systémique dans les plantes, large spectre d'action, lutte contre des maladies bactériennes et virales pour lesquelles peu de moyens de protection sont disponibles, compatibilité écologique et compatibilité avec les pratiques culturales usuelles. Les SDN ne doivent pas occulter certains inconvénients que les recherches des prochaines années devront contourner. Bien que les effets des SDN soient efficaces et reproductibles en conditions contrôlées au laboratoire, il s'avère, que leur application *in natura* soit plus délicate et présente généralement des efficacités très variables et décevantes. Pour confronter à ce constat, il faut acquérir des connaissances pour mieux comprendre les réactions de la plante, la variabilité des réponses obtenues en fonction du fond génétique, des agents pathogènes et de l'environnement paraissait indispensable.

Le travail présenté a visé essentiellement d'élucider certaines méthodes d'analyses biologiques et biochimiques pour évaluer l'efficacité des SDN, soit par la mesure de l'activité enzymatique par spectrophotométrie, qui permet de mettre en évidence l'existence d'une réaction de défense suite à l'élicitation, ou soit par l'identification des composés organiques volatils et composés phénoliques par chromatographie.

Nous retiendrons que la plupart de ces produits SDN apparus très prometteurs, à condition que ces genres de molécules ne soit pas trop onéreuses à la fabrication. Ils fournissent actuellement une protection partielle et/ou temporaire, suffisante pour réduire les traitements chimiques habituels mais pas assez pour supprimer tout autre traitement.

Références

1. Abouraïcha EF., Bounnit T., Jay-Allemand C., Coumans M., Martinez C., and El Hadrami I., (2010). La potentialisation des réactions de défense du palmier dattier au moyen de Stifénia. *Biotechnologies du palmier dattier*, 09 :237-245
2. Aljabal M., Picot A., Turner M., Goullitquer S., Charton S., Leblanc C., Claire N., & Sonia H., (2015). Impact of abiotic stresses on the protection efficacy of defence elicitors and on metabolic regulation in tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 223–237
3. Amboraré E., Aziz A, Trotel-Aziz P., Vernet G., Quantinet D., Dhucq L., (2004). Stimulation des défenses naturelles de la vigne. Essais d'emploi du chitosan contre *Botrytis cinerea*. *Revue Phytoma : la défense des végétaux*, 571: 26-29.
4. Andreu AB., Guevara MG., Wolski EA., Daleol GR., Caldiz DO., (2006). Enhancement of natural disease resistance in potatoes by chemicals. *Pest Management Science*, 62:162-170
5. Angelova Z., Georgiev S., &Roos W., (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 13:72-83
6. Aziz A., Poinssot, B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert B., Joubert JM., & Pugin A., (2003). Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 1118–1128
7. Aziz A., Gauthier A., Bezier A., Poinssot B., Joubert JM., Pugin A., Heyraud A., & Baillieul F., (2007). Elicitor and resistance-inducing activities of b-1,4cellodextrins in grapevine, comparison with b-1,3 glucans and a-1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*, 58: 1463-1472
8. Balint-Kurti P., (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology.*, 20(8), 1163–1178
9. Bardin M., Comby M., Troulet C., and Nicot P. (2013). Relationship between the aggressiveness of *Botrytis cinerea* on tomato and the efficacy of biocontrol. *IOBC WPRS Bull*, 86: 163-168
10. Baur P., (1999). Surfactant Effects on Cuticular Penetration of Neutral Polar Compounds: Dependence on Humidity and Temperature, *J. Agric. Food Chem*, 47:753-761
11. Beauchamps C., Fridovich L., (1971). Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44 : 276-287.
12. Belhadj A., Saigne C., Telef N., Cluzet S., Bouscaut J., Corio-Costet MF., and Merillon JM.,(2006). Methyl Jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *J. Agric. Food Chem*, 54: 9119-9125.

Références

13. Benhamou N., (1996). Elicitors- induced plant pathway. Trends in plant science, 8: 233-240
14. Benhamou N., (2009). La résistance chez les plantes : principe de la stratégie défensive et applications agronomiques. Lavoisier, Paris, 376p
15. Benhamou N., Picard K. (2000). La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. Phytoprotection 80: 137-168.
16. Benhamou N., Rey P., (2012). Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. Phytoprotection, 92: 24-35
17. Berthelot R., Daire X., Ponchet M., and Turner M., (2018). Les stimulateurs de défense des plantes - Panorama et solutions d'avenir. Editions acta, Paris, 80p.
18. Blanchard A. & Limache F. (2005). Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN). Rapport bibliographique, ENSAM, ENSAR et INA P-G, 15 pages.
19. Blanchard A., (2017). Les stimulateurs des défenses naturelles des plantes (SDN), histoire d'une innovation phytosanitaire (1977-2007). Rapport bibliographique, HAL ID: hal-01633345, 20 pages.
20. Bubici G., Amenduni M., Colella C., D'Amico M., & Cirulli M., (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
21. Bueter C.L., Specht C.A., and Levitz S.M. (2013). Innate sensing of chitin and chitosan. PLoS Pathogens, 9: e1003080.
22. 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 doctorat, Université de Bourgogne.
23. Chatterjee S., Adhya M., Guha AK., and Chatterjee, BP. (2005). Chitosan from *Mucorrouxii*: production and physico-chemical characterization. Process Biochem. 40, 395-400
24. Cluzet S., Torregrosa C., Jacquet C., Lafitte C., Fournier J., Mercier L., Salamagne S., Briand X., Esquerre-Tugaye M.T., Dumas B., (2004). Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant Cell and Environment*, 27: 917-928
25. Cohen Y., Rubin A.E., Kilfin G., (2010). Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL-beta-amino-butyrac acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology*, 126: 553-573

26. Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., et al., (2006). Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10: 1062-1071
27. Conrath U., Thulke O., Katz V., Schwindling S., Kohler A., (2001). Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 113-119
28. Cordelier S., de Ruffray P., Fritig B., Kauffmann S., (2003). Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Mol. Biol.*, 51: 235-238.
29. Damoiseau L., (2008). L'an deux d'ABIM – marchés, produits, lois : tout nouveau tout bio. *Revue Phytoma: la défense des végétaux*, 613: 18-21.
30. Dempsey D.A., Klessig D.F., (1994). Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends in cell biology*, 5: 334-338
31. Dufour M.C., (2011). Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis* induites par élévation face à la diversité génétique de bioagresseurs (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*) : du gène au champ. Thèse Doctorat n°1847. Université Bordeaux-Victor Segalen, p54
32. Ebehardt M.V., Lee C.Y., and Liu R.H., (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405: 903-904.
33. Ebel J., Mithöfer A., (1998). Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, 206:335–348.
34. Ebner C., Hoffmann-Sommergruber K., and Breiteneder H., (2001). Plant food allergens homologous to pathogenesis related proteins. *Allergy*, 56: 43-44.
35. Ecker J.R., (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268: 667-675
36. Esnault D., Klarzynski O., Euzen M., Hery P., (2005). La laminarine, Quel apport en situation de septoriose résistante aux Qol. *Revue Phytoma : la défense des végétaux*, 587: 49-51.
37. Falcon-Rodriguez A.B., Cabrera J.C., Ortega E., Martinez-Tellez M.A., (2009). Concentration and physicochemical properties of chitosan derivatives determine the induction of defense responses in roots and leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4: 192-200

38. Faessel L., Gomy C., Nassr N., Tostivint C., Hipper C., and Dechanteloup A., (2014). Centre d'Études et de Prospective du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAAF).
39. Gullino M.L., Leroux P., and Smith C.M., (2000). Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection*, 19:1–11
40. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., (1974). Glutathione S-Transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry*, 249 (22): 7130-7139.
41. Hachoud S., Sanchez-Muñoz R., Cusido RM., Palazon J., Yahaoui Zaidi R., Zaidi F., (2019). Stimulation of defense reactions in potato against *Pectobacterium* sp. *Journal of General Plant Pathology*, 85:257–272
42. Hamiduzzaman M.M., Jaka G., Barnavon L., Neuhaus J.M., and Mauch-mani B., (2005). β Aminobutyric Acid-Induced Resistance Against Downy Mildew in Grapevine Acts Through the Potentiation of Callose Formation and Jasmonic Acid Signaling. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, 18, 819–829
43. He P.Q., Tian L., Chen K-S., Hao L.H., and Li G.Y., (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
44. Heath M.C., (2002). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.*, 44: 321-334.
45. Herth A., (2011). Le biocontrôle pour la protection des cultures : 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes. Rapport au Premier ministre François Fillon Mission parlementaire auprès de Bruno Le Maire, ministre de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du territoire, confiée à Antoine Herth, député du Bas-Rhin. 156p
46. Hindumathy CK., Shailasree S., RamachandraKini k., and Shekar Shetty H., (2006). Spore cell wall components of *Aspergillus niger* elicit downy mildew disease resistance in pearl millet. *Phytopathology / Mycology* 34(1): 72-86.
47. Huang CH., Vallad GE., Zhang S., Wen A., Balogh B., Figueiredo JFL., Behlau F., Jones JB., Momol MT., and Olson SM.,(2012). Effect of Application Frequency and Reduced Rates of Acibenzolar- S -Methyl on the Field Efficacy of Induced Resistance Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Dis*, 96: 221–227
48. Huang Y.J., Hood J.R., Eckert M.R., Stonard J.F., Cools H.J., King G.J., Rossall S., Ashworth M., Fitt B.D.L.,(2011). Effects of fungicide on growth of *Leptosphaeria maculans* and *L.biglobosa* in relation to development of phoma stem canker on oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathology*, 60: 607-620

49. Iriti M., Vitalini S., Di Tommaso G., D'Amico S., Borgo M., Faoro F.,(2011).New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17: 263-269
50. Jakab G., Ton J., Flors V., Zimmerli L., Me´traux J.P., and Mauch-Mani B., (2005). Enhancing *Arabidopsis*, salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol.* 139: 267-274.
51. Jalil SU., Mishra M., and Ansari MI., (2015). Current View on Chitinase for Plant Defence. *Trends in Biosciences* 8(24) ,12 : 6734-6743
52. Jones J.D.G., and Dangl J.L., (2006). The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329
53. Jourdan E., Ongena M., Thonart P., (2008). Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12(4), 437-449
54. 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.
55. Klarzynski. O., Fritig. B., (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 324:953–963.
56. Kobayashi A., Koghuchi Y., Kanzaki H., Kajiyama S.I., and Kawasu K., (1994). A new type of antimicrobial phenolics produced by plant peroxidase ads its possible role in the chemical defence systems against plant pathogens. *Zeitschrift fir Naturforschung* 49: 411-414.
57. Koga J., Kubota H.Gomi S., Umemura K., Ohnishi M., and Kono T., (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.
58. Kurosaki F., Tashiro N., and Nishi A., (1988). Role of chitinase and chitin oligosaccharides in lignification response of cultured carrot cells treated with mycelial walls. *Plant and Cell Physiology*, 29: 527–531.
59. Kvaratskhelia M., Winkel C., Thomeley N.F.R., (1997). Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. *Plant Physiology*, 114: 1237-1245.
60. La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S., Hoffmann L., Fritig B., Legrand M., Heitz T.,(2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*, 198: 267-284

61. Lam E., Kato N., Lawton M., (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411: 848-853
62. Lannou C., Roby D., Ravigné V., Hannachi M., Moury B., (2021). L'Immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux maladies, éditions Quæ, Versailles, 392 p
63. Lee H.I., Leon J., Raskin I., (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 4076-4079
64. Leroux P., Delorme R., et Gaillardon P., (2002). Évolution des produits phytosanitaires à usages agricoles. Les fongicides. *Revue Phytoma*, 545 : 8-15
65. Liaquat F., and Eltem R. (2018). Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. *Carbohydr. Polym.*, 184: 243–259.
66. Liu H., Jiang W., Bi Y., Luo Y., (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. Cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biol. Technol.*, 35: 263-269.
67. Lyon G., (2007). Agents that can elicit induced resistance, pp 9-29. In Walters D., Newton A., Lyon G., (2007). *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 264p.
68. Lyon G.D., Newton A.C., (1997). Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? *Plant Pathology*, 46: 636–641
69. Martinez C., Loison M., (2006). Stifénia, un exemple concret. *Revue Phytoma : la défense des végétaux*, 598: 42-45.
70. Mitchell H.J., Walters D.R., (2004). Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection. *Pest Manag. Sci.*, 60: 126-134.
71. Mohan R., and Kolattukudy P.E., (1990). Differential activation of expression of a suberization-associated anionic peroxidase gene in near-isogenic resistant and susceptible tomato line by elicitors. *Plant Physiology*, 92: 276-280.
72. Molinari S., & Loffredo E., (2006). The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68:69-78.
73. Nürnberger T., & Brunner F., (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion. Plant Biology*, 5: 318-324

Références

74. Oerke EC., and Dehne HW., (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23:275–285
75. Pajot E., (2005). Stimulators of natural defences: new allies for rational protection. *PHM Revue Horticole*: p14
76. Paris F., Krzyzaniak Y., Gauthier C., Jamois F., Domergue F., Joubès J., *et al.* (2015). An ethoxylated surfactant enhances the penetration of the sulfated laminarin through leaf cuticle and stomata, leading to increased induced resistance against grapevine downy mildew. *Physiol. Plant*, 14: 1-14
77. Parkhurst JR., and Hodgins DS., (1971). Phenylalanine and tyrosine ammonia-lyase activity in *Sporobolomyces pararoseus*, *Phytochemistry*, 10: 2997-3000
78. Pereira A., (2016). Plant Abiotic Stress Challenges from the Changing Environment. *Frontiers in Plant Science*, 7 : 1123.
79. Pieterse C.M.J., Ton J., Van Loon L.C., (2001). Cross talk between plant defence signaling pathways: boost or burden. *AgBiotechNet*, 68: 1-8
80. Porta H., & Rocha-Sosa M., (2002). Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiology*, 130: 15-21
81. Radman R., Saez T., Bucke C., and Keshavarz T. (2003). Review – elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 37: 91-102.
82. Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasam V., Samiyappan R., (2000). Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20: 1-11.
83. Ryals J.A., Neuenschwander U.H., Willis MG., Molina A., Steiner H.Y., Hunt M.D., (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8: 425-449.
84. Sanz-Alfárez S., Mateos B., Alvarado R., Sánchez M., (2008). SAR induction in tomato plants is not effective against root-knot nematode infection. *Eur. J. Plant Pathol*, 120: 417-425.
85. Sayegh M., (2009). La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* & pathovar *malvacearum*. Rôle du gène GhLOX1 dans la réaction hypersensible. Thèse doctorat, p : 11. Institut national polytechnique de lorraine.
86. Schoener S., Krause G.H., (1990). Protective systems against oxygen species in spinach: response to cold acclimatation in excess light. *Planta*, 180 : 383-389

87. Sharathchandra R.G., Niranjan Raj S., Shetty N.P., Amruthesh K.N., and Shetty H.S., (2004). A chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Prot*, 23: 881-888.
88. Tamogami S., Rakwal R., Kodama O., (1997). Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. *FEBS Letters*, 412 : 61 -64
89. Terry LA., Joyce DC., (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* 32: 1-13.
90. Trdà L., Boutrot F., Claverie J., Brulé D., Dorey S., and Poinssot B. (2015). Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Front. Plant Sci.* 6.
91. Trotel-Aziz P., Couderchet M., Vernet G., and Aziz A., (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 405-413.
92. Trouvelot S., Dubreuil C., Gauthier A., Pugin A., Daire X., et Poinssot B., (2006). La potentialisation des défenses naturelles des plantes. *Revue Phytoma : la défense des végétaux*, 598: 38-40.
93. Trouvelot S., Varnier A.L., Allègre M., Mercier L., Baillieul F., Arnould C., Gianinazzi-Pearson V., Klarzynski O., Joubert J.M., Pugin A., and Daire X., (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.
94. Turner J.G., Ellis C., & Devoto A., (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* 14(supplement): S153-S164.
95. Vallad G.E., and Goodman R.M., (2004). Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science*, 44: 1920-1934.
96. Van Hulten M., Pelser M., Van Loon LC., Pieterse C.M. J., and Ton J., (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103: 5602-5607
97. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.
98. Van Peer R., Niemann G.J., Schippers B., (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 81: 728-734.

99. Vo T.S., Ngo D.H., Kang K.H., Jung W.K., and Kim S.K. (2015). The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. *Mol. Nutr. Food Res*, 59: 129–138
100. Walters D.R., Havis N.D., Sablou C., Walsh D.J., (2011). Possible trade-off associated with the use of a combination of resistance elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75: 188-192
101. Walters D.R., Ratsep J., and Havis N.D., (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64 : 1263-1280
102. Wei Z.M., Laby R.J., Zumoff C.H., Bauer D.W., He S.Y., Colimer A., Beer S.V., (1992). Harpin, Elicitor of the Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257: 84-88
103. Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M., (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414: 562-565
104. Zeringue H.J., (1992). Effect of C₆–C₁₀ alkenals and alkanals on eliciting a defence response in the developing cotton boll. *Phytochemistry*, 31: 2305–2308
105. Zhou Y., Dahler J.M., Underhill S.J.R., Wills R.B.H., (2003). Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. *Food chemistry*, 80: 565-572.

Sites bibliographiques :

1. Cours de physiologie végétale, La spécificité des interactions plantes/pathogènes <https://www.ebiologie.fr/cours/s/91/la-specificite-des-interactions-plantes-pathogenes> (consultés le 16 MAI 2021).
2. Définition des SDP, Réseau d'experts ELICITRA. https://www.elicitra.org/index.php?rub=definition_des_sdp (consulté le 20 avril 2021).

Annexes

Tableau 01. Exemples d'efficacité publiés dans la littérature scientifique : traitements avec différents SDP. (Fayssel *et al.* 2014)

SDP = Stimulateurs de défense des plantes

SDP	Espèce végétale	Bioagresseur	Conditions expérimentales	Mode d'application	Critère évalué	% d'efficacité	Source
Maladies fongiques							
Milsana - Renouée de Sakhaline	Tomate	<i>Leveillula taurica</i>	Serre	Pulvérisation foliaire	Indice de sévérité	23-64%	(Konstantinidou-Doltsinis, et al., 2006)
	Blé	<i>Blumeria graminis</i>	Serre	Pulvérisation foliaire	Nombre de colonies fongiques	85-100%	(Randoux, et al., 2006)
	Concombre	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Serre	Pulvérisation foliaire	Nombre de plants infectés	45-90%	(Schmitt, 2002)
PGPR	Tabac	<i>Peronospora tabacina</i>	Serre	Traitement de semence et irrigation	Indice de sévérité	5-60%	(Zhang, et al., 2004)
<i>Bacillus mycooides</i>	Betterave sucrière	<i>Cercospora beticola</i>	Serre et Champ	?	Nombre de plants infectés	38-91%	(Bargabus, et al., 2002)
Algicin – Extrait d'algues	Pommier	<i>Venturia inaequalis</i>	Serre	Pulvérisation foliaire 18h avant inoculation	Incidence de la maladie Incidence de la maladie	55-75%	(Kunz & Hinze, 2014)
Iodus - Laminarine						40-68%	
Chitosan				60-85%			
Algicin – Extrait d'algues				20-35%			
Chitosan				18-35%			
Isotianil	Riz	<i>Magnaporthe grisea</i>	Serre et Champ	Pulvérisation foliaire	Incidence de la maladie	80-100%	(Sawada, 2009)
		<i>Rhizoctonia solani</i>				0-50%	
	Tomate	<i>Oidiopsis sicula</i>				50-69%	
		<i>Phytophthora infestans</i>				50-69%	
BABA	Vigne cv. Riesling x Sylvaner	<i>Plasmoapara viticola</i>	Serre	Pulvérisation foliaire	Lésions sur feuilles	10-50%	(Tamm, et al., 2011)
Extrait de <i>Penicillium chrysogenum</i>			Vignoble			50%	
			Serre			70-90%	
Bion – ASM			Serre			97%	
			Vignoble			0-90%	
Milsana - Renouée de Sakhaline			Serre			46%	
	Serre	0-50%					

Annexes

(Suite) :

SDP	Espèce végétale	Bioagresseur	Conditions expérimentales	Mode d'application	Critère évalué	% d'efficacité	Source
Acide salicylique			Serre			0-70%	
Maladies Virales							
PGPR	Tomate	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>	Serre	?	Nombre de plantes sans symptôme	48%	(Zehnder, et al., 2000)
Isotianil	Tabac	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Serre et Champ	Pulvérisation foliaire	Incidence de la maladie	20-69%	(Sawada, 2009)
Maladies bactériennes							
Chitosan	Pommier	<i>Erwinia amylovora</i>	Verger	Pulvérisation foliaire	Incidence de la maladie	12%-35%	(Kunz, et al., 2012)
Serenade - <i>Bacillus subtilis</i> QST 713						36-56%	