



HAL
open science

**Caractérisation de la diffusion de la laminarine,
polysaccharide inducteur de résistance contre le mildiou,
dans des tissus foliaires de vigne**

Samuel Marchat

► **To cite this version:**

Samuel Marchat. Caractérisation de la diffusion de la laminarine, polysaccharide inducteur de résistance contre le mildiou, dans des tissus foliaires de vigne. Sciences du Vivant [q-bio]. 2015. hal-02793866

HAL Id: hal-02793866

<https://hal.inrae.fr/hal-02793866>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Caractérisation de la diffusion de la laminarine,
polysaccharide inducteur de résistance contre le mildiou,
dans des tissus foliaires de vigne**

Samuel MARCHAT

Master 2 Biotechnologie des Plantes Tropicales

Promotion 2014-2015

Encadrants :

Sophie TROUVELOT

Maître de Conférences à
l'Université de Bourgogne
(IUVV)

Xavier DAIRE

Ingénieur de Recherche INRA

UMR 1347 Agroécologie

AgroSup/INRA/Université de Bourgogne
Pôle Interactions Plantes-Microorganismes

Résumé

La vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.) est sensible à de nombreux agents pathogènes qui affectent les vignobles et ont un impact non négligeable sur les récoltes. Un des principaux parasites de la vigne, *Plasmopara viticola* (agent du mildiou) rend inévitable l'utilisation de fongicides et la lutte contre cet agent pathogène est celle qui occasionne le plus de traitements. Face à ce constat, des méthodes de lutte alternatives sont actuellement développées, notamment par l'application de stimulateurs de défenses des plantes (SDP). La laminarine, un polysaccharide extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*, présente une efficacité démontrée en tant qu'éliciteur. Malgré son homologation en tant que traitement phytosanitaire, son utilisation en viticulture reste très controversée étant donné la forte variabilité des résultats obtenus en tant qu'inducteur de résistance au vignoble. Pour expliquer ce manque d'efficacité, l'hypothèse principale s'oriente vers une faible biodisponibilité de ce polysaccharide hydrophile compte-tenu des propriétés hydrophobes de la cuticule. L'objectif de cette étude est d'identifier les voies de pénétration de ce composé dans la feuille, notamment par des méthodes de microscopie biphotonique et d'immuno-marquage. Les résultats montrent clairement que la voie stomatique constitue une porte d'entrée privilégiée pour ce type de composé au sein de la feuille. De plus, il semblerait que le passage transcuticulaire soit également possible, notamment au niveau des parois anticlinales des cellules épidermiques proches des stomates mais aussi au niveau de cellules peri-vasculaires. Nos résultats suggèrent par conséquent que de telles molécules peuvent emprunter la voie apoplastique pour diffuser dans les tissus de la feuille. Ces observations fournissent des pistes pour l'amélioration de l'application de ces produits au vignoble.

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci à Sophie Trouvelot et Xavier Daire pour m'avoir encadré tout au long de ce stage, pour leur gentillesse, leur pédagogie et leur grande disponibilité (même pendant leurs vacances). J'ai énormément appris à vos côtés. Ce fût un vrai plaisir de travailler avec vous.

Je remercie Marielle Adrian et toute l'équipe « Résistance Induite » de l'UMR Agroécologie. Merci à tous de m'avoir accueilli avec beaucoup de sympathie.

Merci également à Jeannine Lherminier et Véronique Aubert pour m'avoir formé aux techniques de microscopie électronique et surtout pour leur gentillesse et leur soutien dans mon projet.

Merci à Christine Arnould pour m'avoir formé à la microscopie confocale, pour sa grande sympathie et sa bonne humeur (et pour m'avoir mis des grilles).

Merci également à Pascale Winckler qui m'a formé à la microscopie biphotonique.

Merci à Yuko Krzyżaniak qui a été ma grande sœur pendant 6 mois. C'est toi qui m'as fait découvrir Dijon et ses bars pour la première fois et merci pour ton aide précieuse au cours de ce stage. Bien sûr, je n'oublie pas son acolyte Alice Hunter. Vous allez beaucoup me manquer !

Evidemment, un énorme merci à Antonin Douillet et Hugo Le Guenno avec qui j'ai passé que de bons moments, que ce soit en microtomie, aux Berthoms, à Beconne ou ailleurs. Vous allez beaucoup me manquer les gars. Les rendez-vous à Montpellier, en Bretagne, à Bordeaux et à Dijon sont déjà prévus, je compte sur vous !

Je remercie aussi tous les stagiaires et thésards que j'ai rencontrés au cours de mon stage, pendant les Beer-Time et les soirées qu'on a passé ensemble, notamment avec Jérémie, Damien, Vincent, Nora, Leny, Julie, Laure-Anne, Cannelle, Danaé, Nathan, Bastien, Alice, Florent, Antoine, Justine, Hervé... Et tous ceux que je n'ai pas cités, la liste est bien longue. Merci pour cette bonne ambiance, toutes ces soirées vont me manquer...

De manière générale, un grand merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées pendant ce stage, toujours très sympathiques et accueillantes. J'espère avoir l'occasion de tous vous revoir.

Merci à tous !!!!!!!

Acronymes et abréviations

AC β -1,3 : Anticorps anti β -1,3 glucanes.

DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern ; motif moléculaire associé à une dégradation

De : Dehscofix CO 125.

ETI : Effector-Triggered Immunity ; immunité déclenchée par la perception d'un effecteur.

ETS : Effector-Triggered Susceptibility ; effecteur déclenchant la sensibilité.

H11 : laminarine naturelle.

Hpt : Heure post-traitement.

LRB : Lissamine Rhodamine B

M/PAMP : Microbe/Pathogen-Associated Molecular Pattern ; motif moléculaire associé à un microbe/pathogène.

NGS : Normal Goat Serum ; sérum commun de chèvre.

NT : Non Traité.

OE : Oxyde d'éthylène.

OS : Oligosaccharide.

PBS : Phosphate Buffered Saline ; solution saline tamponnée au phosphate.

PR Proteins : Pathogenesis Related Proteins ; protéines associées à la pathogénèse.

PRR : Pattern Recognition Receptors ; récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires.

PS : Polysaccharide.

PS3 : Phycarine Sulfatée avec environ 3 groupements sulfates par résidu de glucose ; laminarine sulfatée.

PTI : PAMP-Triggered Immunity ; immunité déclenchée par la perception de PAMP.

SDP : Stimulateur de Défenses des Plantes.

Table des matières

I. Introduction.....	1
1. Importance économique de la viticulture en France.....	1
2. Le mildiou de la vigne.....	1
3. L'immunité végétale.....	2
4. Stimulation des défenses et protection des plantes.....	3
5. Les glucanes en tant qu'inducteurs de résistance.....	4
6. Problématique.....	4
II. Matériel et méthode	5
1. Matériel	5
1.1. Matériel végétal	5
1.2. Polysaccharides d'étude et tensio-actif	6
2. Méthodes	6
2.1. Etude de la diffusion du saccharose et de la laminarine marquée avec la LRB par microscopie biphotonique	6
2.2. Etude de la diffusion de la laminarine par immunocytoologie	7
2.2.1. Traitement	7
2.2.2. Fixation	7
2.2.3. Déshydratation	7
2.2.4. Inclusion et polymérisation	7
2.2.5. Réalisation de coupes semi- et ultra-fines	7
2.2.6. Observation des coupes semi-fines	8
2.2.7. Immunomarquage de la laminarine	8
III. Résultats	8
1. Observation de la diffusion du saccharose marqué avec la LRB par microscopie biphotonique	8
2. Observation de la diffusion de la laminarine marquée à la LRB par microscopie biphotonique	9
3. Détection de la laminarine in planta, après immuno-marquage.....	9
IV. Discussion	10
Bibliographie	

Le Mildiou de la Vigne (*Plasmopara viticola*)

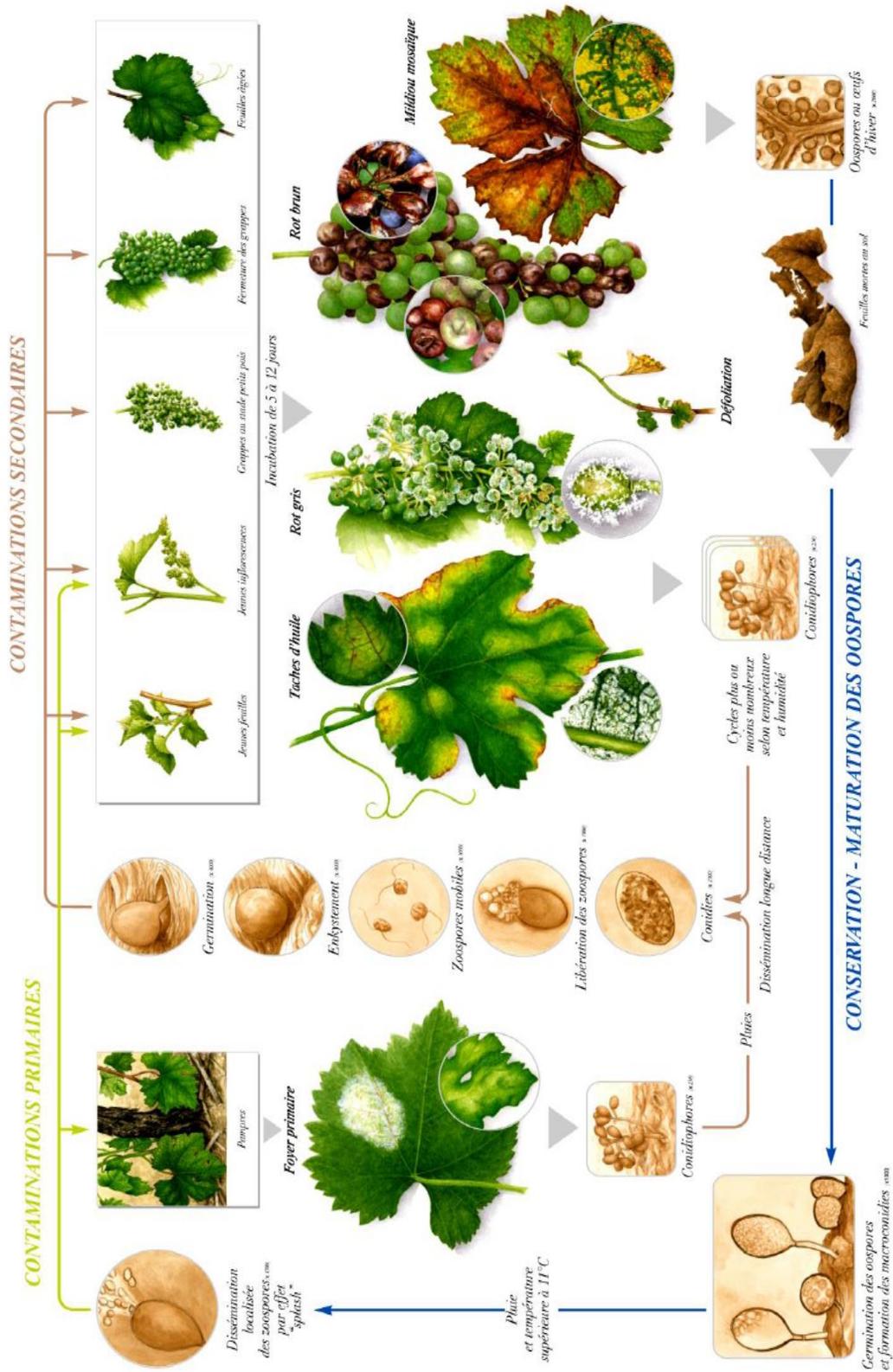


Figure 1 : Cycle de développement de *Plasmopara viticola* et symptômes de la maladie sur vigne (d'après Vincent Jeannerot et Michel Clerjeau, paru dans Bayer CropScience, 2001).

I. Introduction

1. Importance économique de la viticulture en France

Les vignes appartiennent à la famille des *Vitaceae* et plus précisément au genre *Vitis*, divisé en deux sous-genres, *Muscadinia* et *Euvitis*, ce dernier regroupant la quasi-totalité des vignes cultivées. Le sous-genre *Euvitis* comprend 3 groupes dont le premier, dit euro-asiatique, ne comporte qu'une seule espèce, *Vitis vinifera* Linné. Celle-ci comprend deux sous-espèces, *Vitis vinifera silvestris*, la vigne sauvage ou lambrusque, et *Vitis vinifera sativa* qui correspond à la vigne cultivée et comprend de nombreux cultivars ou variétés (Huglin & Schneider, 1998).

En France, la viticulture occupe une place économique et patrimoniale importante. Premier pays producteur de vin en 2014, la France se classe également au 4^{ème} rang en terme de production de raisin. Cette culture représente 15% de la valeur de la production agricole pour seulement 2,6 % des surfaces utilisées. Chaque année, 85 000 exploitations produisent une moyenne de 48 millions d'hectolitres de vin (FranceAgrimer, 2013). La France est par ailleurs le deuxième consommateur de vin au monde, après les Etats-Unis, et se classe 3^e plus grand pays exportateur de vins dans le monde en volume mais 1^{er} en valeur. En 2013, le chiffre d'affaires des exportations françaises de vins a atteint 9,8 milliards d'euros.

2. Le mildiou de la vigne

La vigne cultivée (*V. vinifera* L.) est sensible à de nombreux agents pathogènes, qui affectent les vignobles et ont un impact non négligeable sur les récoltes. Un des principaux parasites de la vigne, *Plasmopara viticola* (agent responsable du mildiou), est originaire des Etats-Unis et a été accidentellement introduit en Europe par l'importation de porte-greffes américain résistant au phylloxéra, à la fin du XIX^{ème} siècle.

Depuis son introduction, cet organisme phytopathogène s'est largement répandu, les variétés de *V. vinifera* étant en majeure partie très sensibles au mildiou (Wong *et al.*, 2001).

Cet oomycète est un endoparasite, biotrophe obligatoire, inféodé à la vigne. Le développement de *P. viticola* se fait selon deux cycles. Un cycle sexué passant par la formation d'oospores dormantes (œufs d'hiver), leur germination printanière libérant des zoospores aptes à infecter les tissus hôtes par l'établissement d'un mycélium parasitaire responsable de l'infection primaire (**Figure 1**). Particulièrement résistantes au froid, les oospores constituent ainsi la principale forme de conservation hivernale du parasite dans les feuilles tombées au sol. Les œufs arrivent à maturité dans le courant du printemps et vont germer dès que la température deviendra propice (11°C), en présence d'eau libre. Un cycle asexué, passant du mycélium à la formation de zoospores générées dans des sporocystes portés par des sporocystophores, permet de propager des infections secondaires lors de la période végétative. La sporulation des formes asexuées nécessite des températures plus douces (18°C) que celles permettant la germination des structures sexuées. *P. viticola* infecte aussi bien les feuilles, provoquant alors une diminution des photosynthétats disponibles, que les vrilles, les inflorescences et les jeunes grappes (**Figure 1**). De ce fait, cette maladie altère tant la longévité des ceps (par un défaut de mise en réserves) que la qualité des raisins (par un défaut de maturité) (Dubos, 2002).

Au vignoble, le mildiou rendit inévitable l'utilisation de fongicides dès le XIX^{ème} siècle. Par conséquent, la lutte contre cet agent pathogène est celle qui occasionne le plus de traitements (jusqu'à ¾ des applications) (Anses, 2012). Cependant, certaines études, notamment menées par le laboratoire

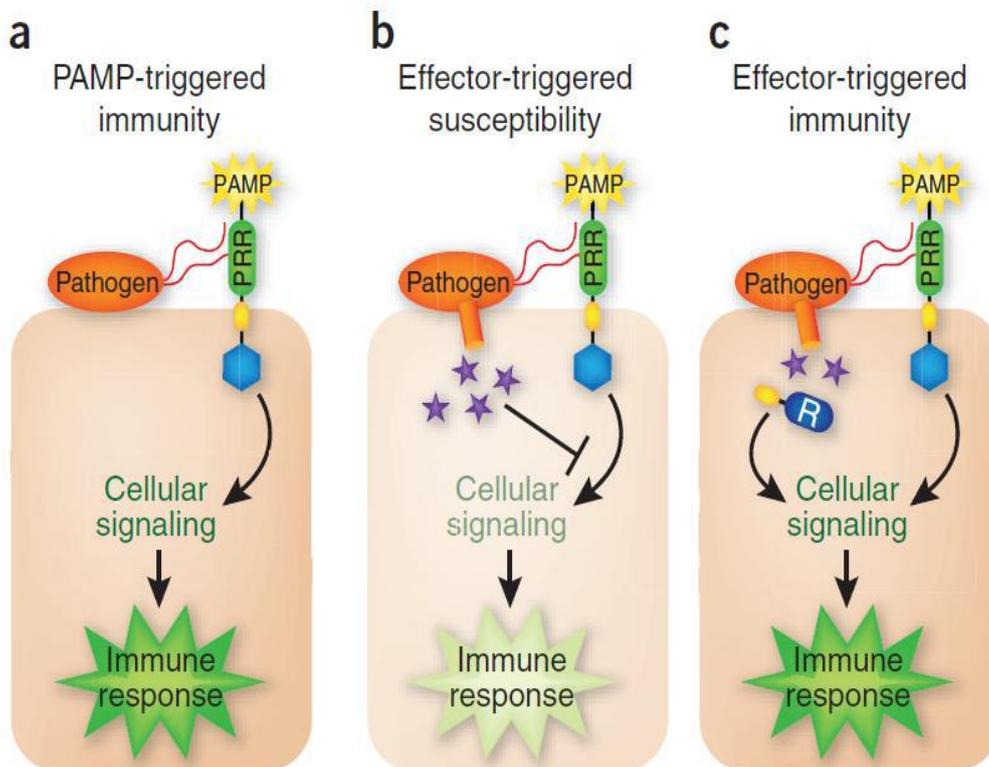


Figure 2 : Représentation schématique du système immunitaire végétal (d'après Pieterse, *et al.*, 2009).

a) Lors de l'attaque du végétal par un agent potentiellement pathogène, des motifs moléculaires associés à celui-ci (PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern) activent des récepteurs membranaires de l'hôte capables de les reconnaître (PRR : Pattern Recognition Receptors). S'en suit alors une cascade de signalisation qui aboutit à l'expression de l'immunité déclenchée par perception de pareils motifs (encore appelée PTI : PAMP-Triggered Immunity) ; b) les agents pathogènes virulents possèdent des effecteurs (produits des gènes de virulence et schématisés ici par des étoiles violettes), suppresseurs de la réponse immunitaire de type PTI, aboutissant à un regain de sensibilité du végétal (encore appelée ETS : Effector-Triggered Susceptibility), déclenchée sous l'action de ces effecteurs ; c) en retour, au cours de l'évolution, les plantes ont acquis la possibilité de synthétiser des protéines R (produits des gènes de résistance) qui reconnaissent spécifiquement les effecteurs des agents pathogènes, aboutissant à un second niveau de réponse immunitaire (appelée ETI : Effector-Triggered Immunity).

de l'Anses, ont mis en évidence la présence de souches résistantes aux fongicides anti-mildiou, démontrant ainsi la limite de l'utilisation intensive de certaines substances actives.

En parallèle, le ministère de l'Agriculture a mis en place le plan Ecophyto visant, si possible, à diminuer de moitié l'usage des produits phytosanitaires (Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008). Ce plan, pourtant légitime et indispensable dans le contexte socio-économique et environnemental actuel, augmente d'autant plus les contraintes liées à la protection du vignoble.

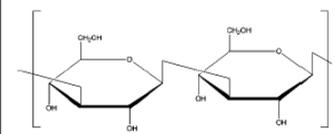
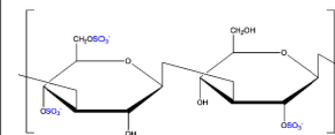
Depuis plusieurs années, les efforts de recherche se concentrent par conséquent sur le développement de méthodes alternatives (ou complémentaires) visant à diminuer l'utilisation de fongicides de synthèse. Récemment, le développement d'outils d'aide à la décision a notamment permis de limiter les traitements aux périodes les plus sensibles, en considérant tant la dynamique de la maladie que les conditions climatiques. Cependant, ces outils permettent de limiter l'utilisation des fongicides sans pour autant s'en dispenser. Par conséquent, plusieurs équipes de recherche se sont concentrées sur la stimulation de l'immunité végétale, notamment par l'utilisation de substances naturelles appelées « Stimulateurs de Défenses des Plantes » (SDP), qui constitue une des stratégies possibles pour limiter le recours aux fongicides.

3. L'immunité végétale

Pour répondre à l'agression d'un organisme phytopathogène, la plante possède plusieurs mécanismes de défenses. En effet, les défenses constitutives ou passives constituent des barrières soit structurelles (cuticules, cires, paroi cellulaire) soit chimiques (exsudats racinaires, composés phénoliques). Lorsqu'un bio-agresseur parvient toutefois à franchir ces défenses passives, il est alors confronté aux mécanismes d'immunité innée de la plante. Dans ce contexte, la plante va pouvoir détecter l'intrusion parasitaire, notamment par la perception à la surface de l'agent pathogène de motifs moléculaires conservés, et d'induire ses mécanismes de défenses en retour (Boller et Felix, 2009, Tsuda et Katagiri, 2010). Ce dialogue moléculaire est initié au niveau de la membrane plasmique de la cellule végétale par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques appelés PRR (Pattern Recognition Receptors ; **Figure 2**). Ces derniers sont capables d'interagir avec certains composés provenant (i) de la paroi ou d'excrétions de l'agent pathogène (Microbe/Pathogen-Associated Molecular Pattern, M/PAMP) détectés comme non-soi, ou (ii) issus directement de la paroi végétale suite à sa dégradation par l'agent pathogène (Damage-Associated Molecular Pattern, DAMP) détectés comme soi modifié. Ainsi les plantes peuvent reconnaître des motifs moléculaires variés tels que la flagelline des bactéries, les chito-oligosaccharides constituant la paroi des champignons phytopathogènes ou encore les polymères d'acide oligogalacturonique générés suite à l'hydrolyse de la paroi végétale. Ces motifs moléculaires perçus par la plante sont qualifiés d'éliciteurs (de l'anglais « elicit », provoquer) du fait de leur aptitude à induire les défenses végétales. En effet, une fois activé par la perception d'un éliciteur, le récepteur va induire une cascade de signalisation permettant d'activer l'expression de gènes de défenses, la synthèse de phytoalexines à activité fongitoxique et de protéines PR (Pathogenesis Related Proteins). Cette signalisation, dont l'aspect spatio-temporel est crucial, a comme messagers des flux d'ions, un burst oxydatif ou encore des cascades de phosphorylation produites par l'action de MAP-kinases (Garcia-Bruger *et al.*, 2006).

Au cours de l'évolution, ce mécanisme de stimulation de la défense innée, encore appelé PTI (PAMP-Triggered Immunity), a pu être contourné par des bio-agresseurs grâce à la synthèse de protéines effectrices capables de le supprimer. Ce mécanisme, appelé ETS (Effector-Triggered Susceptibility), va conduire à la sensibilité du végétal (**Figure 2**) et par conséquent à une interaction compatible se traduisant par le développement de la maladie. Cependant, la plante (ou tout au moins certains

Tableau 1 : Formules chimiques et caractéristiques de la laminarine et de son dérivé sulfaté (Daire, communication personnelle).

Type	Nom	Formule chimique	Caractéristiques
Oligosaccharide	Laminarine (H11)		<ul style="list-style-type: none"> • β-1,3 Glucane • Degré de polymérisation : 25 unités de glucose • Poids moléculaire : entre 4500 et 5400 g/mol
	Laminarine sulfatée (PS3)		<ul style="list-style-type: none"> • β-1,3 Glucane sulfaté • Degré de polymérisation : 25 unités de glucose • Degré de sulfatation : 2,4 sulfates par unité de glucose • Poids moléculaire : entre 9300 et 10 020 g/mol

génotypes) a pu s'adapter en sélectionnant des gènes de résistance dont les produits sont capables d'identifier spécifiquement ces effecteurs. Ce type de perception conduit à un second niveau de résistance, appelé ETI (Effector-Triggered Immunity), provoquant une réponse plus intense souvent liée à une réaction d'hypersensibilité. Cependant ce mécanisme, basé sur une reconnaissance gène pour gène (gène d'avirulence vs gène de résistance) est généralement pathogène-dépendant voire race-dépendant.

4. Stimulation des défenses et protection des plantes

La stimulation des défenses végétales est une solution prometteuse pour la protection des plantes. En mimant l'attaque d'un agent pathogène, l'induction précoce des défenses végétales va conduire à une résistance accrue de la plante face à ce dernier. Ces molécules dites « élicitrices », souvent qualifiées de Stimulateur des Défenses des Plantes (SDP), peuvent-être de diverses origines, biotiques ou abiotiques, et présenter des modes d'actions différents.

Une première catégorie de SDP comprend les composés de type MAMP, qui vont provoquer une cascade de signalisation dès leur application. La laminarine est un β -1,3 glucane linéaire (**Tableau 1**) extrait de l'algue brune *Laminaria digitata* qui présente une activité élicitrice (Aziz *et al.*, 2003). Biodégradable, son utilisation ne nécessite pas de délai avant récolte, ce qui limite les contraintes réglementaires imposées par l'emploi de produits phytosanitaires. Cette substance, commercialisée sous les noms de Vacciplant® et IODUS® 2 par l'entreprise Goëmar, a été le premier éliciteur homologué en France et est utilisé dans plusieurs contextes culturels (céréales à pailles, fraisier, laitue, pommier et vigne) (E-phy, 2015). La chitine est également un composé de type MAMP. Présent dans la paroi des champignons, dans l'exosquelette d'arthropodes et dans l'endosquelette des céphalopodes, ce polysaccharide induit également les réactions de défenses végétales (Boller et Felix, 2009). Le chitosan, issu de la désacétylation de la chitine, est à la fois capable d'inhiber le développement de différents champignons et d'éliciter les réactions de défense végétale (Rabea *et al.*, 2003). Récemment a émergé l'idée d'apporter conjointement des molécules de type MAMP et DAMP. Ainsi, FYTOSAVE®, qui est un mélange à base d'oligochitosane (MAMP) et d'oligopectine (DAMP), est en cours d'homologation.

Une seconde catégorie de SDP comprend les produits dont le composé actif, agissant probablement comme un MAMP, n'est pas clairement identifié. C'est le cas du STIFENIA®, produit à partir de broyat de graines de *Trigonella foenum-graecum* (Fenugrec), déjà homologué sur vigne et melon, notamment pour traiter l'oïdium, même si son efficacité est controversée au vignoble. MILSANA®, commercialisé sous forme d'extrait éthanolique brut de racines de *Reynoutria sachalinensis* (Renouée de Sakhaline) rentre également dans cette catégorie. Il présente une bonne efficacité sous serre sur oïdiums de légumes et de fleurs (Reignault, 2013) mais n'est cependant pas homologué en France.

Enfin, une troisième catégorie de SDP concerne les molécules intervenant directement dans les cascades de signalisation de la plante et qui vont conduire à mobiliser ses défenses. Généralement représentés par des phytohormones impliquées dans l'immunité, ces SDP peuvent être des molécules analogues de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique ou encore des formes réactives de l'oxygène. Une des préparations les plus connues, BION®, est composée à 50% d'acibenzolar-S-méthyl, un analogue de l'acide salicylique. Son usage est autorisé en France sur de nombreuses cultures (bananier, blé, tomate, kiwi, laitue, ...) (E-phy, 2015).

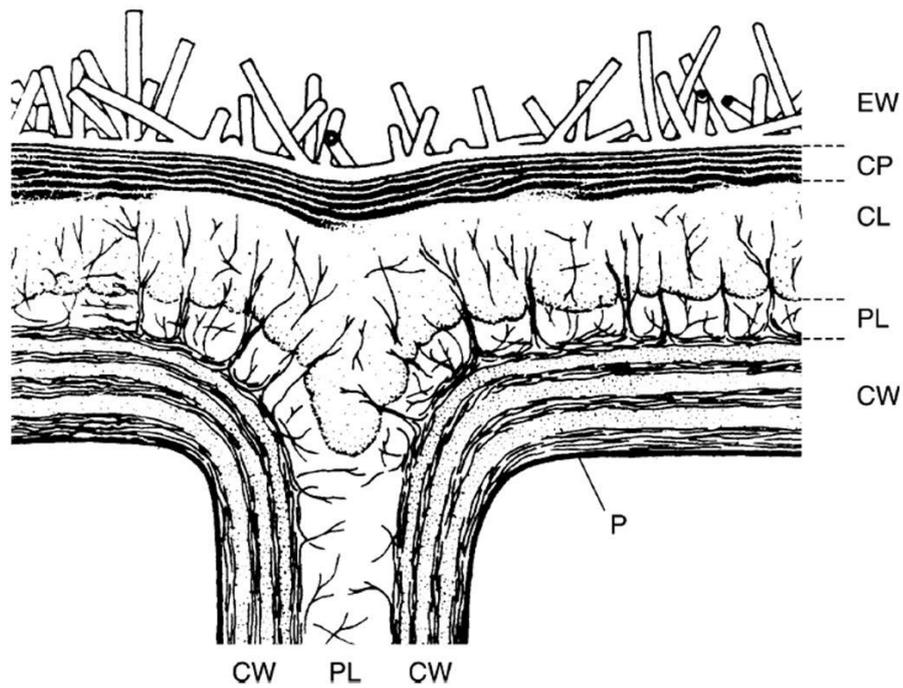


Figure 3 : Représentation schématique de la structure de la cuticule et de la paroi cellulaire des cellules épidermiques de feuilles (d'après Buchholz, 2006).

EW : cires épicuticulaires ; CP : cuticule lamellaire ; CL : couche cuticulaire composée de cutine et de polysaccharides ; PL : lamelle pectique ; CW : paroi cellulaire ; P : membrane plasmique.

5. Les glucanes en tant qu'inducteurs de résistance

Les oligo- et polysaccharides (OS / PS) sont des glucides complexes constitués de monomères d'oses reliés entre eux par une liaison glycosidique. Chez les plantes, les OS / PS sont impliqués dans les mécanismes de croissance et de développement, notamment en jouant le rôle de molécules signales (Smeekens *et al.*, 2010). Ceux dérivés de micro-organismes, d'algues ou de parois de cellules végétales sont également impliqués dans les signaux de défenses chez les végétaux, principalement grâce aux mécanismes de reconnaissance des M/DAMP (Coté et Hahn, 1994). La laminarine est un β -1,3 glucane linéaire (PS) extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*. Plusieurs travaux ont démontré son activité élicitrice, notamment chez la vigne où son application induit entre autres l'accumulation de phytoalexines, la synthèse de protéines PR (pathogenesis-related) (Aziz *et al.*, 2003) et les réponses dépendantes de l'éthylène chez le tabac et *Arabidopsis thaliana* (Ménard *et al.*, 2004). De structure similaire aux β -1,3 glucanes constituant les parois fongiques, la laminarine est ainsi considérée comme un composé de type MAMP. Toutefois, le récepteur intervenant dans sa perception demeure encore inconnu. Malgré son efficacité, amplement démontrée en laboratoire, son utilisation en viticulture reste très controversée étant donné la forte variabilité des résultats obtenus au vignoble.

Chez les plantes et les animaux, les OS et les PS peuvent naturellement porter des résidus de sulfates souvent indispensables pour remplir leurs fonctions biologiques comme les facteurs Nod (Roche *et al.*, 1991). Partant de ce constat, l'entreprise Goëmar a donc synthétisé la laminarine sulfatée, dénommée PS3 (Phycarine Sulfatée avec environ 3 groupements sulfates par résidu de glucose ; **Tableau 1**), à l'aide d'un procédé chimique. Contre *P. viticola*, son efficacité est nettement plus importante et plus reproductible que celle de la laminarine naturelle et PS3 induit des réponses défensives dépendantes de l'acide salicylique et de l'éthylène chez le tabac (Ménard *et al.*, 2004) et de l'acide jasmonique chez la vigne (Trouvelot *et al.*, 2008). Son efficacité au vignoble est supérieure à la laminarine mais elle reste insuffisante contre le mildiou.

Hors conditions contrôlées, l'efficacité des éliciteurs est dépendante de nombreux facteurs comme les conditions environnementales, les propriétés physico-chimiques de la formulation, la physiologie de la plante, son génotype (Fernández et Eichert, 2009 ; Walter, 2013) mais aussi très probablement du taux de pénétration. L'une des principales hypothèses pour expliquer la faible efficacité des PS s'oriente vers une limitation de la diffusion cuticulaire de ces polysaccharides, en lien avec leurs propriétés hydrophiles. Dans ce contexte, la cuticule constituerait une barrière (physique et chimique) pouvant influencer la pénétration de la laminarine dans les cellules végétales, et par conséquent sa perception et donc son efficacité.

6. Problématique

La cuticule possède une épaisseur variable selon les espèces végétales et leur physiologie (0,1 à 10 μ m) et se compose d'une succession de 3 couches majeures (**Figure 3**) :

- les cires épicuticulaires formant la couche la plus externe,
- la cuticule proprement dite, possédant une structure lamellaire constituée de cires intracuticulaires et de cutine,
- la couche la plus interne, constituée, en plus de la cutine, de matériel dérivant de la paroi externe des cellules épidermique comme les polysaccharides.

D'un point de vue chimique, les cires épicuticulaires se composent principalement d'alcane, d'acides gras, d'aldéhydes, d'alcools primaires et secondaires, de cétones et d'esters. Ces cires sont spécifiques de l'espèce végétale, de l'organe et de l'environnement. La cutine est un polymère d'acide gras à 16

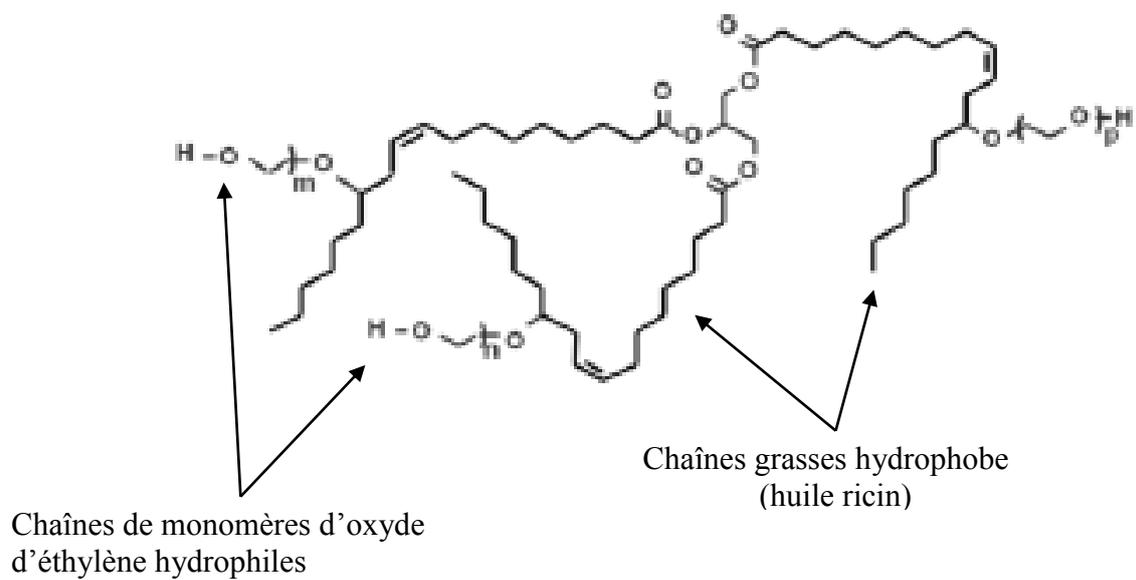


Figure 4 : Formule chimique du DEHSCOFIX® CO 125 (Huntsman Corporation, Salt Lake City, UT, USA).

ou 18 carbones, comportant des fonctions hydroxyles (-OH) et carboxyles (-COOH). L'ensemble de la cuticule forme donc une barrière majoritairement hydrophobe qui va permettre à la plante de limiter ses pertes en eau mais également de se protéger contre les UV, de certains agents potentiellement pathogènes ou des composés étrangers non désirables (Goodwin et Jenks, 2005). Or, la laminarine est un polysaccharide hydrophile et les propriétés physico-chimiques de la cuticule doivent certainement limiter son passage et par conséquent sa perception.

Il est possible d'augmenter la pénétration des molécules hydrophiles par l'ajout d'un tensioactif plutôt hydrophile, c'est-à-dire riche en oxyde d'éthylène (OE), un composé organique possédant des propriétés hydrophiles (Ramsey *et al.*, 2005). Stock et Holloway (1993) se sont focalisés sur la longueur de la chaîne d'OE des tensio-actifs et de son influence sur l'assimilation des substances actives. Cette étude a permis de conclure que les substances lipophiles pénètrent généralement mieux en présence d'un tensioactif possédant une faible teneur en monomères d'OE (5-6 unités) tandis que les substances hydrophiles pénètrent mieux en présence de longues chaînes d'OE (10-20 unités). De plus, il a été démontré que les tensioactifs possédant une forte teneur en OE augmentent la perméabilité de la cuticule à l'eau. Plusieurs tensio-actifs de ce type ont été évalués au laboratoire et il s'avère que le Dehscofix® CO 125 (De), produit à partir d'huile de ricin très ethoxylée (35 motifs ethoxylés, **Figure 4**), augmente l'efficacité de la laminarine en conditions contrôlées, vraisemblablement par augmentation de sa pénétration. Cependant, les voies de pénétration des PS dans la feuille sont très mal connues.

Des travaux d'imagerie confocale récemment réalisés au sein l'équipe sur *Arabidopsis thaliana* ont permis de montrer une accumulation plus importante de la laminarine, en présence de De, au niveau des stomates et des cellules de l'épiderme voisines. La laminarine ayant pénétrée semble capable de diffuser à travers la cuticule, le long des parois anticlinales pour s'accumuler dans les vacuoles des cellules du parenchyme (Krzyzaniak, 2014), mais cela est toutefois moins évident. Ces travaux ayant été réalisés chez l'arabette (plante modèle), l'objectif de cette étude est d'identifier les voies de pénétration empruntées par ce type de PS chez la vigne (plante d'intérêt agronomique), notamment par une approche de microscopie biphotonique. Cette technique permet de réaliser des observations sur des échantillons épais comme la feuille de vigne, grâce à une meilleure pénétration du laser, une plus grande sensibilité de détection et une meilleure résolution spatiale que celles obtenues en microscopie confocale. Dans un second temps, une approche de microscopie électronique à transmission associée à un immunomarquage de la laminarine a été mise au point afin d'étudier plus précisément la pénétration et la localisation de la laminarine dans la feuille de vigne.

II. Matériel et méthode

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Des plants de vigne de la variété Marselan (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon x *Vitis vinifera* cv. Grenache Noir ; obtention INRA, 1961), produits par bouturage herbacé, ont été utilisés. Ce matériel végétal est classiquement utilisé au laboratoire en tant que variété sensible au mildiou. Un mois post-bouturage, les plants sont repotés individuellement dans des godets (10 x 10 x 7 cm) contenant un mélange de tourbe-perlite (3/2 ; v/v) et sont fertilisés quotidiennement par sub-irrigation (N-P-K 10/10/10 ; p/p/p et oligoéléments ; Plantin, France). Les plants sont cultivés sous serre avec une photopériode de 16h de jour, une température jour/nuit de 23°C/18°C et une hygrométrie relative de 50%. Après 4 semaines de croissance, seules les feuilles de rang 2 (**Figure 5**) sont prélevées pour

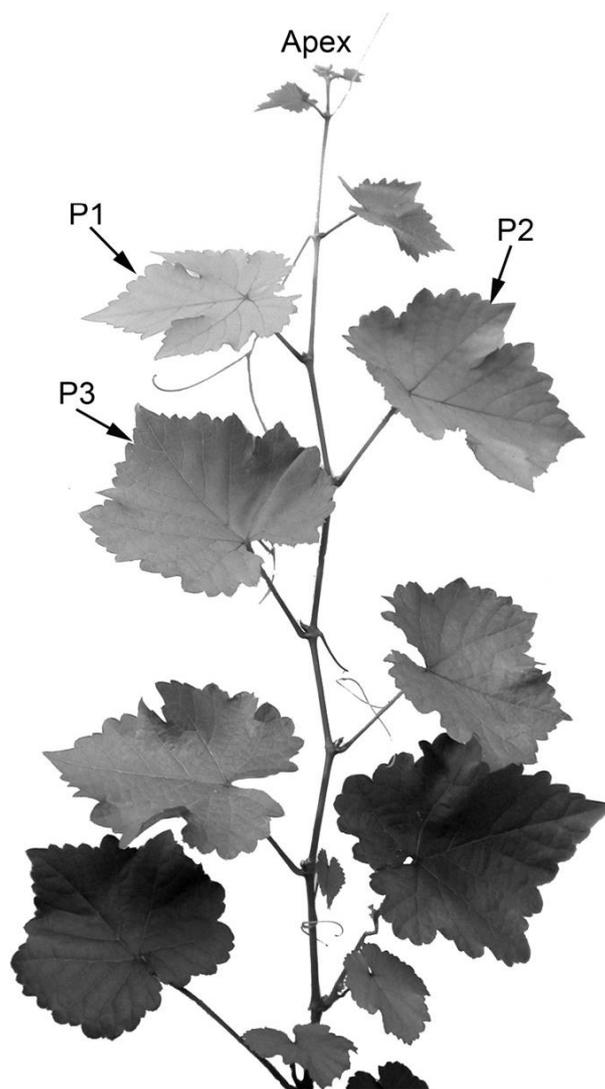


Figure 5 : Positions des rangs foliaires établis sur boutures herbacées de vigne (*V. vinifera* cv. Marselan) (d'après Steimetz *et al.*, 2012).

Dans nos conditions expérimentales, seules les feuilles de rangs 2 ont été utilisées. Légende : P1 : rang 1 ; P2 : rang 2 ; P3 : rang 3.

être traitées par la solution élicitrice. Les feuilles plus âgées présentent en effet une résistance ontogénique au mildiou (Steimetz *et al.*, 2012 ; à voir).

1.2. Polysaccharides d'étude et tensio-actif

La laminarine (H11), extraite et purifiée à partir de l'algue brune *L. digitata*, et son dérivé chimique sulfaté (PS3), ont des degrés de polymérisation compris entre 25 et 30 unités de glucose. Ils sont produits par les laboratoires Goëmar (Saint-Malo, France). Sur vigne et dans les conditions du laboratoire, la laminarine est appliquée concentrée à 1g/L, préparée dans une solution de Dehscofix CO 125 (Huntsman Corporation, Salt Lake City, UT, USA) à 0,1 ou 0,5% (v/v) selon les expérimentations.

Pour les observations effectuées en microscopie biphotonique, la laminarine naturelle a été préalablement marquée avec la Lissamine Rhodamine B (LRB) au sein de l'école de chimie de Rennes. Ce fluorochrome possède une longueur d'onde d'excitation de 570 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm.

2. Méthodes

2.1. Etude de la diffusion du saccharose et de la laminarine marquée avec la LRB par microscopie biphotonique

Après 4 semaines de croissance, des feuilles de vigne de rang 2 (**Figure 5**) sont prélevées sur des boutures herbacées. Afin de limiter leur flétrissement progressif durant la période de traitement et d'étude, leur pétiole est taillé en biseau avant d'être placé dans un tube Falcon® 15 mL rempli d'eau osmosée. Le traitement disaccharidique est réalisé par dépôt d'une gouttelette d'1 µL de saccharose, préparée à 1g/L dans une solution de De à 0,5%. Les dépôts sont effectués sur la face supérieure et sur la face inférieure de la feuille, sur 4 zones inter-nervaires. Le traitement polysaccharidique est réalisé par dépôt d'une gouttelette d'1 µL de laminarine, préparée à 1g/L dans une solution de De à 0,5%. Les dépôts sont effectués sur la face inférieure sur 3 zones nervaires et 3 zones inter-nervaires, soit 6 zones de dépôts par échantillon foliaire. Pour les deux types de traitement, les observations sont effectuées 48 heures post-traitement (hpt). La zone de dépôt est prélevée à l'aide d'un scalpel et lavée avec du Tween-20 à 0,1% avant d'être placée entre lame et lamelle. L'eau osmosée est utilisée comme milieu de montage. Les observations sont effectuées sur un microscope biphotonique Nikon (Tokyo, Japon) A1-MP avec un objectif Plan Apo IR 60x NA 1,27 à immersion dans l'eau. Un laser à infrarouge Chameleon (Coherent, Santa Clara, CA, USA) est utilisé pour fournir une longueur d'onde d'excitation de 840 nm. L'émission de fluorescence est collectée sur deux canaux de détection : un canal orange FF01-575/25-25 [563-588] nm, et un canal rouge FF01-629/56-25 [601-657] nm (Semrock, Rochester, New York, USA). Les acquisitions sont effectuées avec une puissance laser ajustée à 2% et un gain de 90V pour les deux canaux orange et rouge. Les images sont acquises avec une résolution de 1024 x 1024, une section optique de 50 +/- 10 µm de profondeur et un pas de 0,5 µm le long de l'axe Z.

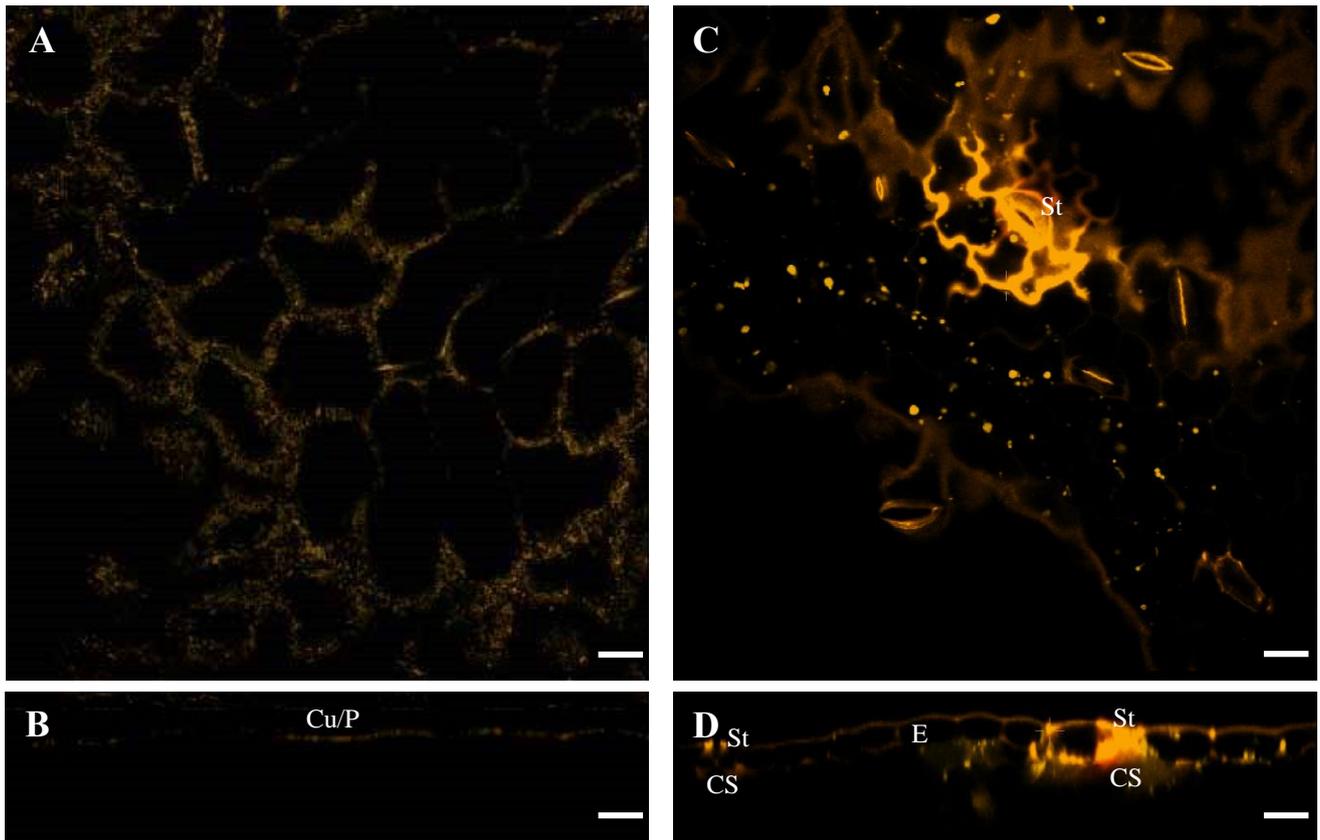


Figure 6 : Observation en microscopie biphotonique des profils de diffusion du saccharose sur feuille de vigne 48 h post-traitement. (A-B) : dépôts effectués sur la face supérieure. (C-D) : dépôts effectués sur la face inférieure. A et C : vue d'ensemble de la zone d'observation dans le plan (x,y) x 63. B et D : plan (x,z) x 63, vue en coupe transversale. Légende : St : stomate ; CS : cavité sous stomatique ; Cu/P : cuticule/ ; E : épiderme. Barre d'échelle représentant 20 μm .

2.2. Etude de la diffusion de la laminarine par immunocytologie

2.2.1. Traitement

Dans cette partie, les feuilles de vigne sont prélevées selon le même protocole que décrit précédemment (cf. partie 2.1.). Le traitement est réalisé par dépôt de 6 gouttelettes d'1 μL , alignées et rapprochées le plus possible. Les dépôts sont effectués sur la face inférieure sur quatre zones internervaires, soit quatre zones de dépôts par feuille à raison de trois feuilles par modalité. Les prélèvements sont effectués 48 hpt. Des témoins non traités (NT) sont également prélevés.

2.2.2. Fixation

La zone traitée est prélevée à l'aide d'une lame de rasoir, sous forme d'une bandelette de 0,3 cm de largeur, puis est immédiatement plongée dans une solution de glutaraldéhyde 0,1% plus paraformaldéhyde 4% préparée en tampon phosphate 0,1M pH 7,2 + saccharose 1%. Cette étape de fixation a pour but la préservation des structures biologiques et des sites antigéniques.

Parallèlement, des zones non traitées ont été prélevées comme témoin négatif. Enfin, certaines d'entre-elles ont été baignées dans une solution de fixation contenant de la laminarine (1g/L, sans adjuvant) afin d'être utilisées comme témoins positif.

Une fois les échantillons placés dans la solution de fixation, une infiltration est effectuée sous vide, à 4°C pendant 30 minutes.

2.2.3. Déshydratation

Les échantillons subissent ensuite une série de bains d'éthanol à différents pourcentages afin de les déshydrater progressivement. Les bains sont effectués pendant 30 min à 1 h selon les concentrations en éthanol suivantes : 1) 30%, 30 min à 4°C ; 2) 50%, 1 h à -20°C ; 3) 70%, 1 h à -20°C ; 4) 95%, 30 min à -20°C ; 5) 100%, 30 min à -20°C.

2.2.4. Inclusion et polymérisation

Avant l'inclusion en résine LR White (London Resin Company, Londres, Angleterre) pure, les échantillons subissent des bains progressifs de mélanges solvant/résine à -20°C pendant 1 h selon les proportions suivantes : 1) 2/3 éthanol 96° + 1/3 résine ; 2) 1/2 éthanol 96° + 1/2 résine ; 3) 1/3 éthanol 96° + 2/3 résine ; 4) résine pure (2 fois une 1 h puis la nuit à 4°C).

Le bain de résine pure est changé une dernière fois avant l'inclusion des échantillons. Les échantillons sont ensuite placés dans des capsules Beem® 00 hemi-hyperbola (Agar Scientific, Cambridge, Angleterre) préalablement numérotées et remplies de résine. L'étape de polymérisation s'effectue sous UV à -20°C en deux étapes : 1) lampe UV supérieure durant 8 h ; 2) lampes UV (supérieures et inférieures) durant 4 h.

2.2.5. Réalisation de coupes semi- et ultra-fines

Les échantillons préalablement inclus sont coupés à l'aide d'un ultra-microtome Reichert-Jung Ultracut E (Cambridge, Angleterre). Les coupes semi-fines sont réalisées à l'aide d'un couteau à diamant histo 45° Diatome (Bienne, Suisse) et les coupes ultra-fines avec un couteau à diamant ultra 35° Diatome. L'angle de coupe est de 6° et l'épaisseur de coupe est de 0,5 μm et 90 nm, respectivement. Les coupes semi-fines sont déposées sur lame de verre (26 x 76mm) et colorées au bleu de toluidine (0,2%, pH 11) tandis que les coupes ultra-fines sont déposées sur des grilles en nickel collodion carbone (maillage 200) préparées par nos soins.

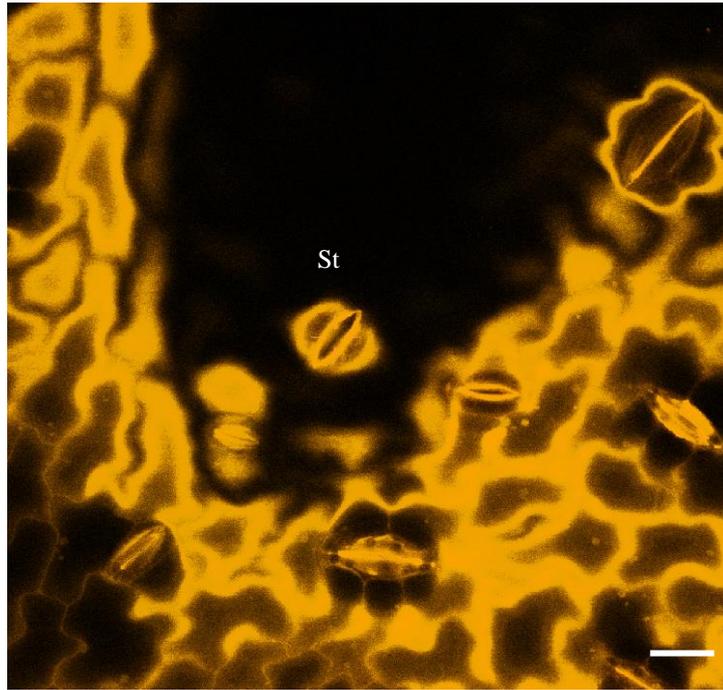


Figure 7 : Observation en microscopie biphotonique des profils de diffusion de la laminarine sur face inférieure de feuille de vigne 48 h post-traitement en zone internervaire.

Vue globale de la zone d'observation dans le plan (x, y) x 63. Barre d'échelle représentant 20 μm . Légende : St : stomate.

2.2.6. Observation des coupes semi-fines

Les échantillons sont observés à l'aide un microscope photonique Leica Leitz DMRB (Wetzlar, Allemagne). Les acquisitions sont réalisées avec une caméra numérique Nikon Digital Sight DS-5Mc, à l'aide du logiciel de capture d'image NIS-Elements BR. Les caractéristiques d'observation sont les suivantes : objectif 20x / 40x ; temps d'exposition : 1,5 s ; gain : 1,20x ; qualité d'acquisition : 2560 x 1920.

2.2.7. Immunomarquage de la laminarine

L'étape d'immunomarquage est réalisée au maximum 24 h après le dépôt des coupes ultra-fines sur grille. La première étape consiste à bloquer les sites antigéniques aspécifiques à l'aide d'une solution de blocage contenant du NGS (Normal Goat Serum) (Aurion, Wageningen, Pays-Bas) concentré à 10% et du lait en poudre filtré (Régilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) dilué à 0,5%, le tout préparé dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) à 10 mM, pH 7,3. Les grilles sont mises à incuber dans une gouttelette de 20 μ L de solution de blocage pendant 30 min à température ambiante. La laminarine est localisée à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti β -1,3 glucane (Biosupplies Australia, Parkville, VIC, Australie) dilué au 1:250 dans du PBS 10mM, pH 7,3. L'anticorps primaire est ensuite localisé (amplification du signal) à l'aide d'un anticorps de chèvre anti-souris marqué à l'or (15nm, Aurion) dilué au 1:25 dans du PBS 10mM, pH 7,3. Pour ces deux anticorps, les échantillons sont mis à incuber pendant 1 h à température ambiante et un contrôle sans anticorps primaire ainsi qu'un témoin non traité ont été réalisés. Les coupes sont contrastées avec une solution d'Uranyle (Delta Microscopies, Mauressac, France) pendant 2 min. Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H-7500 sous une tension de 75 kV.

III. Résultats

1. Observation de la diffusion du saccharose marqué avec la LRB par microscopie biphotonique

Le traitement Saccharose-LRB a été préparé à 1g/L dans une solution de De à 0,5% et appliqué sur la face supérieure et inférieure de la feuille de vigne. Les observations ont été effectuées 48 hpt (**Figure 6**). Sur la face supérieure, la pénétration du saccharose semble très faible et le signal détecté délimite seulement la cuticule de la feuille dans les zones intercellulaire (**Figure 6 A**) mais n'est pas détecté au niveau épidermique (**Figure 6 A-B**). Cependant, il n'est pas possible d'observer si la paroi des cellules épidermiques est marquée, la résolution ne nous permettant pas d'individualiser clairement la paroi et la cuticule.

Sur la face inférieure (**Figure 6 C-D**), la diffusion du traitement saccharose-LRB semble maximale au niveau des stomates et des cavités sous-stomatiques ainsi qu'au niveau des cellules épidermiques avoisinantes. Le signal détecté délimite clairement les parois des cellules de gardes et des cellules épidermiques. De plus, le traitement semble diffuser à l'intérieur de certaines cellules de gardes ainsi que dans certaines cellules épidermiques adjacentes. Cependant, ce profil apparaît de façon aléatoire et n'est pas observé sur toutes les structures cellulaires concernées. Notons par ailleurs qu'outre l'importance du type cellulaire, la pénétration du traitement semble également très dépendante de la zone de dépôt. Par endroit, la diffusion du traitement semble moindre malgré la présence de stomates. En effet, après lavage, la zone de dépôts ne dessine pas une tâche pouvant correspondre à la gouttelette initiale mais celle-ci présente plutôt des spots de fluorescence, suggérant une hétérogénéité dans la diffusion du traitement.

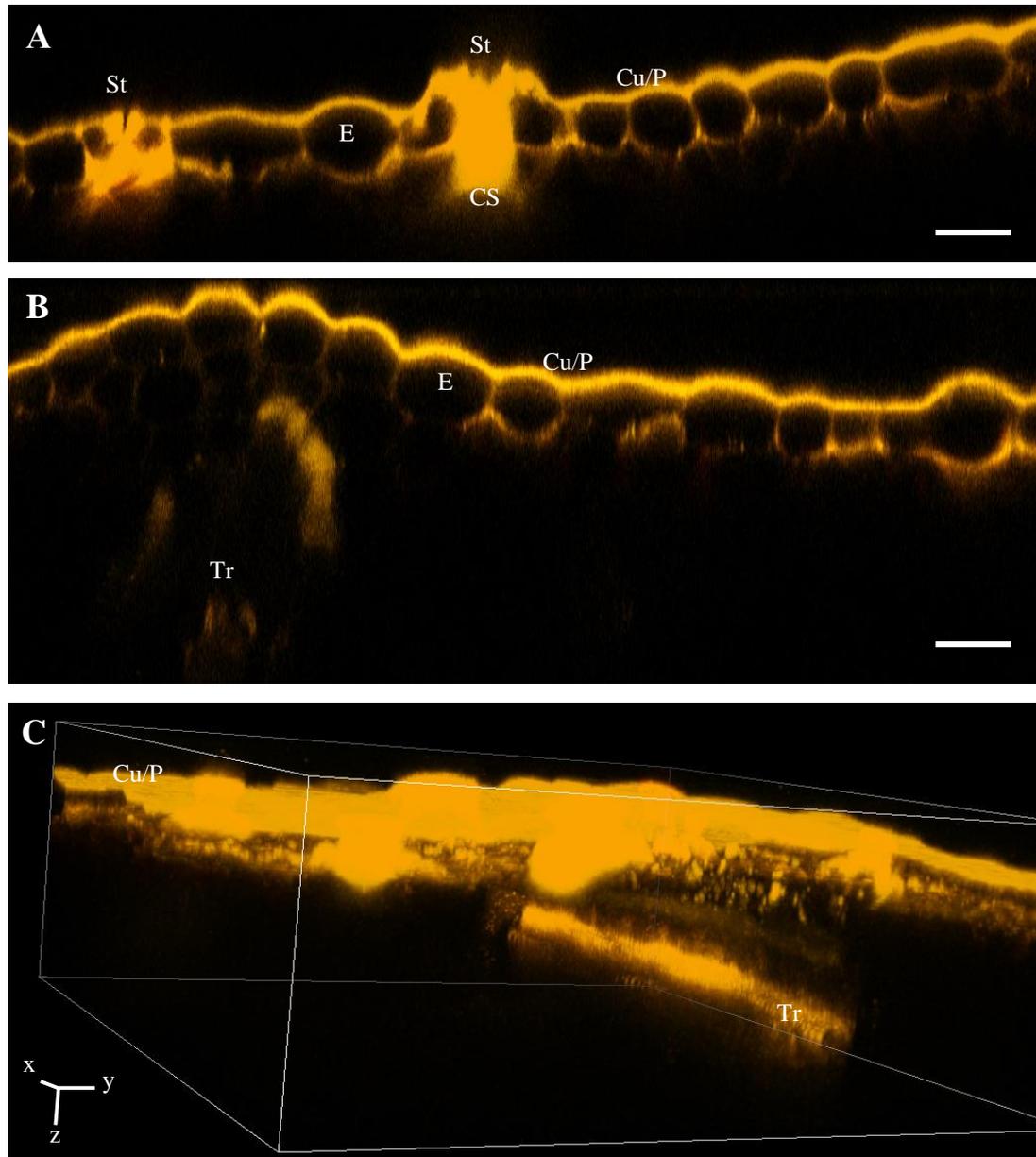


Figure 8 : Observation en microscopie biphotonique des profils de diffusion de la laminarine sur face inférieure de feuille de vigne 48 h post-traitement en zone internervaire.

A : plan (x,z) x 63, vue en coupe transversale d'une zone stomatique ; barre d'échelle représentant 20 μm . **B** : plan (x,z) x 63, vue en coupe transversale à proximité des trachéides (éléments conducteurs de sève brute). **C** : plan (x,y,z) x 63, représentation en 3 dimension de la zone d'observation ; échelle : x = 0,21 μm ; y = 0,21 μm ; z = 0,97 μm . Légende : St : stomate ; CS : cavité sous stomatique ; Cu/P : cuticule/paroi ; E : épiderme ; Tr : Trachéides.

Les zones NT ne présentent quant à elles jamais de fluorescence (données non présentées), confirmant que selon nos paramètres d'observation aucune auto-fluorescence tissulaire n'est détectée.

2. Observation de la diffusion de la laminarine marquée à la LRB par microscopie biphotonique

Le traitement H11-LRB a été préparé à 1g/L dans une solution de De à 0,5% et appliqué sur la face inférieure de la feuille de vigne, aux niveaux nerveire et internerveire. Les observations ont été effectuées 48 hpt (**Figures 7, 8, 9**).

L'observation de l'ensemble de l'aire de dépôt montre que certaines zones permettent une meilleure pénétration du traitement (**Figure 7**). En effet, en dehors de ces sites, le signal est principalement détecté au niveau de l'épiderme, où la fluorescence délimite les parois anticlinales de cette première couche cellulaire. Parfois, seules les cellules de garde des stomates et la cuticule sont marquées par la fluorescence du traitement H11-LRB, suggérant que la voie stomatique constitue une porte d'entrée principale pour ce type de polysaccharide. Dans les zones internerveires (**Figure 8 A-C**), le signal détecté est plus important au niveau des chambres sous-stomatiques et des espaces intercellulaires avoisinant (**Figure 8 A**). La molécule H11-LRB semble également diffuser plus facilement au niveau des cellules de l'épiderme proches des cellules de gardes. Par ailleurs, la diffusion semble facilitée au travers des parois (voie apoplastique) des cellules entourant les éléments vasculaires (trachéides conduisant la sève brute), où un motif de type « nid d'abeille » est observable (**Figure 8 B**). Les parois des cellules épidermiques marquées dans cette zone semblent pourtant éloignées d'un stomate, suggérant une pénétration cuticulaire. Cependant, il est également possible que des stomates se trouvent à proximité de la zone d'observation sans pour autant être visibles dans le plan de coupe. Nous notons toutefois qu'à ce niveau le signal délimite nettement l'élément conducteur (trachéide) tout au long de la zone d'observation, suggérant une diffusion privilégiée et concentrée dans cette partie (**Figure 8 C**).

Dans les zones nerveires, la fluorescence est principalement détectée au niveau de la cuticule et délimite le contour de la nervure (**Figure 9 A-B**). Dans certains sites, le signal est détecté au niveau des parois cellulaires et des espaces intercellulaires des premières couches cellulaires (**Figure 9 A**). Toutefois, notons que la diffusion semble limitée (faible) à ce niveau, ne suggérant pas la présence de voies d'entrée préférentielles à ce niveau.

Conformément aux observations précédentes, les zones NT ne présentent pas de fluorescence (données non présentées).

3. Détection de la laminarine *in planta*, après immuno-marquage

Les possibilités offertes par la microscopie biphotonique ne permettant pas de détecter finement les voies d'entrée de la laminarine *in planta* (localisation intra-cuticulaire notamment), nous avons donc décidé de révéler sa présence *in situ*, dans des tissus foliaires de vigne pré-traitée, à l'aide d'un immuno-marquage.

Afin de définir les paramètres nécessaires à l'étape d'immunomarquage, une série de témoins a été infiltrée dans une solution de fixateur contenant de la laminarine à 1g/L dans le but de développer des témoins positifs permettant d'effectuer cette étape de mise au point. L'objectif a été d'évaluer différentes concentrations en anticorps anti- β -1,3 glucane (AC β -1,3) afin d'identifier la concentration permettant un marquage optimal de la laminarine. L'utilisation de cet anticorps ayant déjà été rapportée dans plusieurs publications (Meikle *et al.*, 1991 ; Cordier *et al.*, 1998) à des dilutions comprises entre 1:50 et 1:1000, nous avons évalué une série de dilutions (1:62, 1:125, 1:250, 1:500 et 1:1000) à éprouver sur nos échantillons (infiltrés et traités par dépôts). Après plusieurs

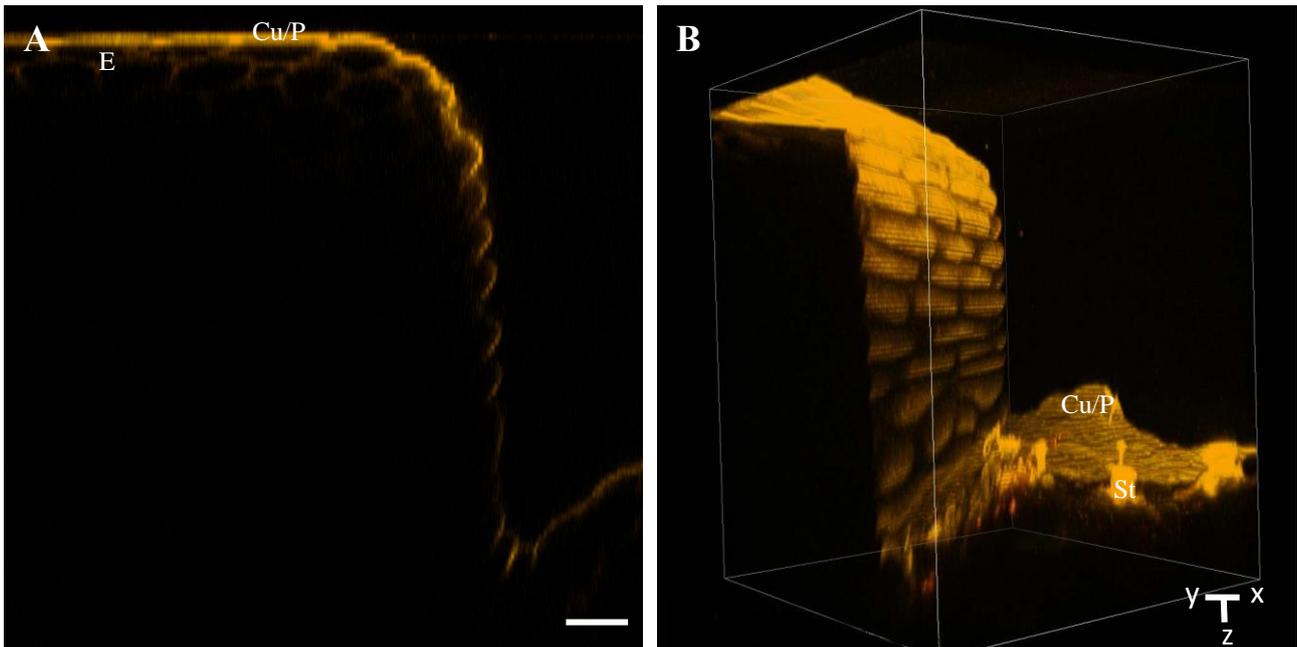


Figure 9 : Observation en microscopie biphotonique des profils de diffusion de la laminarine sur nervure de feuille de vigne 48 h post-traitement (face inférieure).

A : plan (x,z) x 63, vue en coupe transversale d'une zone nervaire ; barre d'échelle représentant 20 μm . **B** : plan (x,y,z) x 63, représentation en 3 dimension de la zone d'observation ; échelle : x-y = 0,21 μm ; z = 2, 33 μm . Légende : Cu/P : cuticule/paroi ; E : épiderme.

répétitions, nous avons estimé, d'après nos observations, que la dilution au 1:250 était à la fois la plus spécifique et la plus sensible pour traiter nos échantillons (données non présentées). A cette concentration d'AC β -1,3 et dans nos conditions d'expérimentations, les fixations aux sites antigéniques aspécifiques sont très faibles. Les témoins NT (**Figures 10, 13 F, 14 F**) et ceux sans anticorps primaires (**Figure 11**) ne montrent pas de marquage, hormis un léger bruit de fond dû aux fixations aspécifiques des deux anticorps (**Figures 10, 11, 13 F, 14 F**).

Chez les témoins infiltrés traités avec cette dilution d'anticorps primaire, un signal de faible intensité est retrouvé dans les stomates (**Figure 12 C**) mais la densité du marquage est cependant plus importante que chez les témoins non traités (**Figure 14 F**). Un signal de forte densité est détecté dans les espaces intercellulaires (**Figure 12 E**) ainsi que dans les éléments conducteurs (trachéides de la sève brute) mais à un degré moins important (**Figure 13 C**). Les témoins sans AC β -1,3 ainsi que les témoins non traités à la laminarine, n'ont jamais présenté de marquage, hormis un léger bruit de fond (**Figures 10, 11, 13 F, 14 F**) observable sur l'ensemble de l'échantillon.

Les échantillons traités par dépôts et prélevés 48 hpt présentaient un marquage superficiel important, en amont de la face inférieure, dans la résine (**Figure 15 C**), suggérant une rétention du produit à la surface de l'organe et par conséquent une proportion non négligeable de polysaccharide qui ne pénètre pas *in planta*. Ce signal est également retrouvé dans la paroi (**Figure 15 C**) et le cytoplasme des cellules de l'épiderme ainsi que dans les stomates (**Figure 14 C**) et les cavités sous-stomatiques, témoignant de la diffusion *in situ* de la laminarine à ces sites. Un marquage est par ailleurs observé au niveau des cellules du parenchyme lacuneux (**Figure 15 D**), plus particulièrement dans les cellules situées en dessous des petits faisceaux conducteurs. Ce marquage est retrouvé jusque dans les éléments vasculaires, notamment dans certains éléments du phloème (**Figure 15 F, G**) et du xylème (données non présentées). Ainsi, le marquage ne se limite pas seulement aux parois cellulaires mais se retrouve également dans le cytoplasme des cellules (voie symplastique).

IV. Discussion

L'objectif de la présente étude est d'identifier plus précisément les voies de pénétrations de polysaccharides inducteurs de résistance tels que la laminarine, pour permettre finalement d'en améliorer les conditions d'applications. En effet, certains éléments suggèrent que l'efficacité de la laminarine pourrait être limitée par une trop faible pénétration dans la feuille, en raison des propriétés hydrophobes de la cuticule contrairement à une affinité pour des molécules hydrophiles. Par exemple, chez le mutant *lacs2* d'*A. thaliana*, qui possède une structure cuticulaire altérée, la pénétration de la laminarine est nettement améliorée (Krzyszaniak, 2014), confirmant que la cuticule constitue un frein à la biodisponibilité des PS.

L'emploi de marqueurs fluorescents en microscopie confocale a déjà été utilisé pour suivre la diffusion de molécules herbicides dans la feuille (Liu *et al.*, 2004a). Pour notre étude, nous avons choisi la LRB. Son spectre d'excitation permet de limiter le bruit de fond lié à l'auto-fluorescence de certains composés cellulaires (comme les chlorophylles) ou de composés pariétaux (Trouvelot, communication personnelle). Pour confirmer que la liaison laminarine-LRB est bien effective et non dégradée *in planta*, la cinétique de pénétration de la LRB seule a été comparée à celle de la laminarine marquée à la LRB. Ces travaux, réalisés antérieurement par notre équipe, ont révélé que la diffusion de la LRB seule est nettement plus rapide que celle de la laminarine marquée, suggérant que la liaison avec le fluorochrome est très certainement stable. D'autres résultats de l'équipe ont déjà montré qu'en absence d'adjuvant, la pénétration de composés hydrophiles est très limitée (Paris *et al.*, soumis). De ce fait, toutes nos expérimentations ont été réalisées en présence de De (tensio-actif).

Non traité

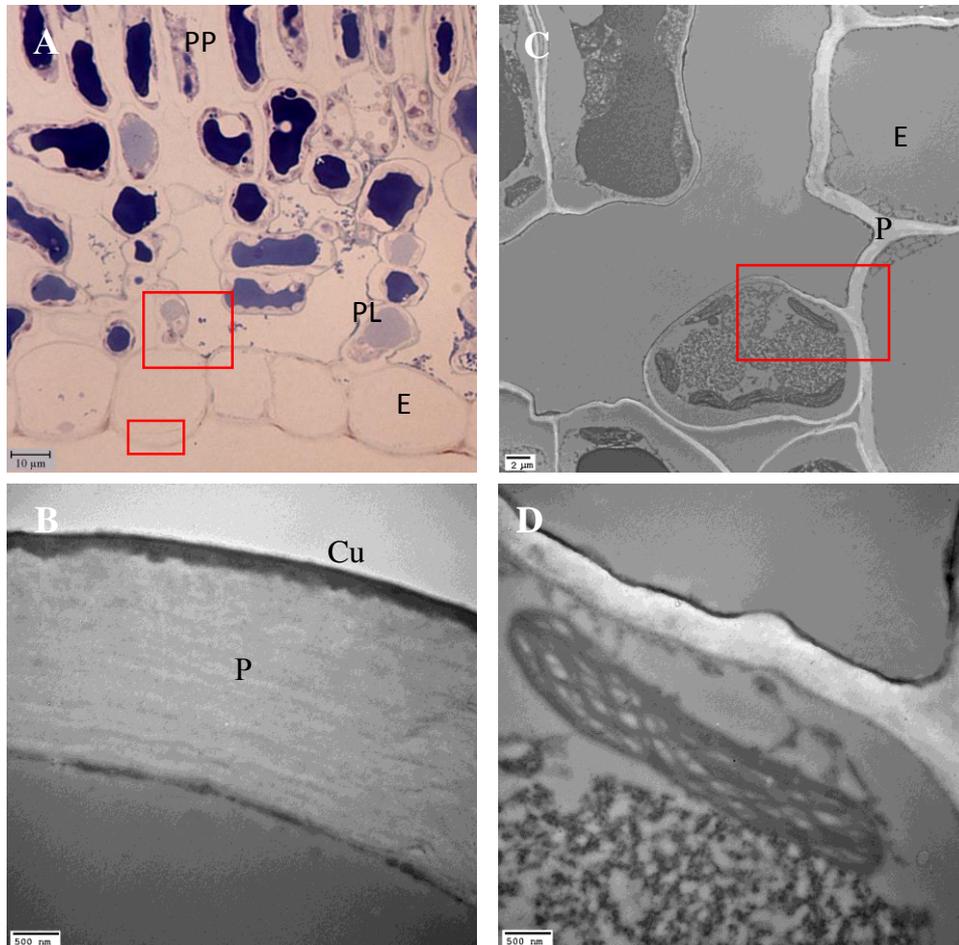


Figure 10 : Observations, en microscopie électronique à transmission (MET) après immuno-marquage, des échantillons de feuilles de vigne non traités.

A : coupes transversales semi-fines de la zone d'observation colorées au bleu de toluidine et observées en microscopie photonique, x 40 ; barre d'échelle représentant 10 μm . **B et E :** coupes transversales ultra-fines représentant la vue d'ensemble de la zone d'observation, observées en MET, X4000 ; barre d'échelle représentant 2 μm . **C, D, F et G :** observation de la zone de marquage en MET, x 30000 ; barre d'échelle représentant 50 nm. Légende : E : épiderme ; St : stomate ; CS : cavité sous-stomatique ; PL : parenchyme lacuneux ; PP : parenchyme palissadique ; Cu : cuticule ; P : paroi. Les carrés rouges représentent la zone de focalisation.

Dans le cas du saccharose, la microscopie biphotonique révèle que la pénétration de ce disaccharide hydrophile est très limitée sur la face adaxiale (supérieure) de la feuille de vigne. Au contraire, suite à un dépôt sur la face abaxiale (inférieure), le taux de pénétration foliaire est beaucoup plus important et les voies stomatiques semblent privilégiées pour la diffusion de ce composé. Ces résultats concordent avec les précédents travaux de l'équipe, qui ont montré que la pénétration de ^{14}C -saccharose, en présence de De, avoisine les 80% sur la face inférieure et est très faible sur la face supérieure (inférieure à 5%) (Paris *et al.*, soumis). Egalement en accord avec ces résultats, Eichert et Golbach (2008) ont démontré chez d'autres espèces végétales que le taux de pénétration du saccharose était inférieur à 1% sur la face supérieure d'une feuille dépourvue de stomates et compris entre 1 et 4 % sur la face inférieure de la feuille, sans adjuvant. Ces résultats peuvent également s'expliquer par la différence d'épaisseur cuticulaire entre les deux surfaces de la feuille. En effet, la cuticule est environ deux fois plus épaisse sur la face supérieure (Paris *et al.*, soumis). De plus, la proportion des constituants majeurs (alcool, alcanes, aldéhyde, acides gras) de la cuticule varie entre les deux surfaces, ce qui peut également influencer la pénétration transcuticulaire des composés hydrophiles.

Pour la première fois chez la vigne, nous observons, en microscopie biphotonique, des résultats similaires à ceux décrits pour des disaccharides avec la laminarine (PS d'environ 25 résidus de glucose). En effet, associée à un adjuvant, la laminarine est capable de pénétrer dans la feuille en empruntant préférentiellement la voie stomatique. Elle est notamment capable de diffuser par l'intermédiaire des cavités sous-stomatiques et dans les espaces intercellulaires (voie apoplastique). Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Eichert *et al.* (2008), qui ont démontré que le passage de molécules hydrophiles de grande taille (jusqu'à $1\mu\text{m}$) était possible à travers les stomates. Une des hypothèses avancées dans ce contexte suggère que la présence de colonies bactériennes à l'intérieur et autour du stomate pourrait faciliter la pénétration de molécules hydrophiles. Ces colonies formeraient un biofilm microbien formant une continuité hydrophile entre l'extérieur et l'intérieur du stomate (Schreiber *et al.*, 2005). Toutefois, une étude menée par Eichert *et al.* (2008) a rapporté que chez *Allium porrum* moins de 10% des stomates recouvrant la surface foliaire participent à ce type de diffusion. Ces résultats peuvent expliquer les variations du profil de pénétration du saccharose et de la laminarine observées dans notre cas en fonction de la zone de dépôt. En effet, certains stomates apparaissent plus perméables que d'autres à l'entrée de composés hydrophiles, définissant un effet « patchy » du profil de diffusion au niveau foliaire.

A la lumière de nos résultats, il apparaît en outre que la laminarine est vraisemblablement capable d'emprunter la voie transcuticulaire pour diffuser *in planta*, puisque le signal détecté délimite dans certains cas les parois des cellules de l'épiderme. Nous montrons également que le traitement diffuse plus facilement à l'intérieur des cellules situées à proximité des stomates, suggérant l'existence de voies d'entrée préférentielles à ces sites. Ainsi, chez la vigne les profils de pénétration de la laminarine semblent correspondre à ceux décrits dans la littérature pour les voies hydrophiles, dans d'autres espèces végétales. D'après Schönherr (2006), il existe des pores hydrophiles enchâssés dans la cuticule. Ces pores se localiseraient principalement au niveau des parois cellulaires anticlinales, des lèvres des cellules de gardes ou au niveau des cellules basales des trichomes. Pourtant, cet auteur indique également que les molécules hydrophiles de taille supérieure à 800 Da ne peuvent pas emprunter cette voie transcuticulaire. Or, la laminarine possède un poids moléculaire d'environ 5 000 Da, qui apparaîtrait contraire à ce processus.

Les profils de diffusion observés en microscopie biphotonique après dépôt sur les nervures suggèrent que la pénétration de la laminarine est faible au niveau des nervures secondaires. Cependant, la

Sans AC β -1,3

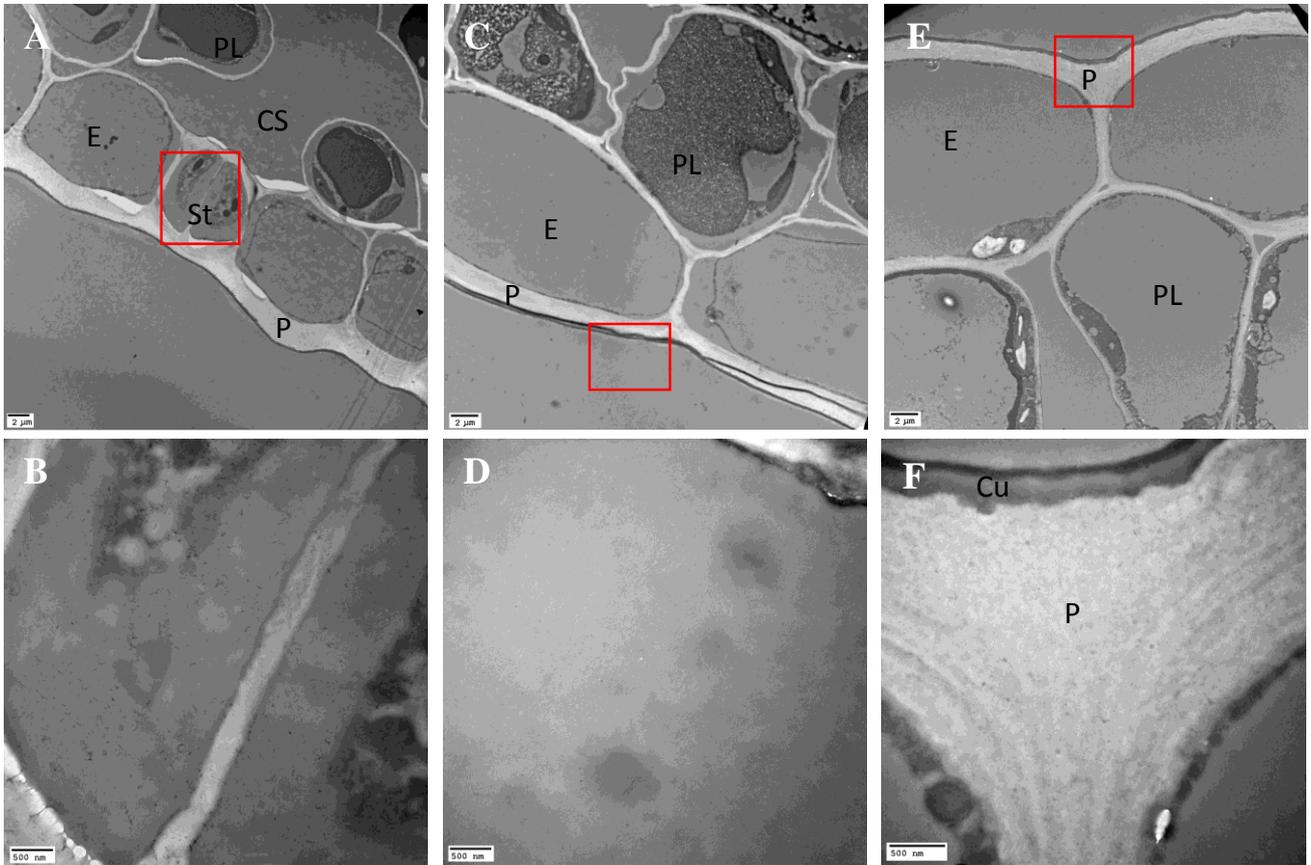


Figure 11 : Observations, en microscopie électronique à transmission (MET), des échantillons traités sans anticorps primaires (AC anti- β -1,3-glucanes).

A-F : échantillons traités à la laminarine et prélevés à 48 hpt. **A, C et E** : coupes transversales ultra-fines représentant la vue d'ensemble de la zone d'observation, observées en MET, X4000 ; barre d'échelle représentant 2 μ m. **B** : observation d'un stomate. **D** : observation de la face inférieure. **F** : observation au niveau d'une paroi anticlinale. **B, D et F** : observations en MET, x 30000 ; barre d'échelle représentant 500 nm. Légende : E : épiderme ; St : stomate ; CS : cavité sous-stomatique ; PL : parenchyme lacuneux ; PP : parenchyme palissadique ; Cu : cuticule. Les carrés rouge représentent la zone de focalisation.

résolution ne permet pas d'identifier clairement si cette pénétration est quasi-nulle ou si la laminarine est rapidement dispersée par les flux de sève, à l'intérieure même de la nervure. De plus, au niveau des nervures secondaires et des nervures fines le signal fluorescent est retrouvé jusque dans les trachéides, suggérant une possible diffusion des PS *in planta* par l'intermédiaire des éléments vascularisés.

Toujours est-il que nos observations en microscopie biphotonique démontrent sans nul doute que la laminarine pénètre préférentiellement par la voie stomatique et que la voie transcuticulaire constituerait possiblement une seconde voie d'entrée.

Afin d'identifier plus précisément les voies de pénétration de la laminarine dans les feuilles de vigne, nous avons entrepris une étude immuno-cytologique. L'objectif a donc été de poursuivre nos investigations avec une méthode de microscopie électronique, plus résolutive, qui permette, en étant associée à un immuno-marquage, d'identifier clairement et spécifiquement la laminarine *in planta* pour déterminer si la voie transcuticulaire pouvait être également empruntée par ce PS. L'originalité de la méthode a nécessité une étape de mise au point assez lourde et fastidieuse. En effet, l'immuno-marquage des témoins positifs infiltrés n'a pas toujours produit des résultats très convaincants et le manque de répétabilité n'a pas permis de présenter le marquage obtenu pour les différentes dilutions d'anticorps primaire. N'ayant aucune idée de l'efficacité de l'infiltration en présence de laminarine, nous avons évalué les différentes dilutions à la suite de nombreuses répétitions, sur plusieurs échantillons infiltrés ou traités par dépôts. Pour ce faire, nous avons analysé conjointement les échantillons ayant répondu positivement au marquage et les témoins NT. En comparant la densité du marquage, nous avons déterminé que la dilution au 1:250 était à la fois la plus spécifique et la plus sensible pour traiter nos échantillons. Par la suite, nous avons remarqué une certaine variation du bruit de fond chez nos témoins NT, certainement influencée par les fluctuations de température ambiante du laboratoire (l'incubation des anticorps primaires et secondaires se réalisant à cette température). Dans ce contexte, il sera donc nécessaire d'améliorer la mise au point, notamment en évaluant différentes méthodes de blocage des sites antigéniques aspécifiques (utilisation de glycine pour exemple) et en effectuant l'incubation des anticorps à température constante, finement régulée, ce qui n'a pas pu être testé par manque de temps. A ces fins, il serait également nécessaire de développer un témoin positif fiable permettant d'éprouver les conditions aboutissant à une meilleure répétabilité des résultats. Par ailleurs, l'application par dépôt du traitement polysaccharidique révèle toute la difficulté de la méthode car rien ne permet d'identifier clairement si les coupes sont bien effectuées dans la zone initiale de dépôt ou dans une zone de diffusion du traitement, les résultats de microscopie biphotonique démontrant bien l'hétérogénéité de la pénétration de la molécule d'intérêt dans les tissus foliaires. En outre, le traitement a été effectué dans du De à 0,1%, dose classiquement utilisée au laboratoire pour les différents pathotests. Pour améliorer la pénétration et pouvoir comparer ces résultats à ceux obtenus en microscopie biphotonique, il aurait été préférable de traiter en présence de De à 0,5%.

Quoi qu'il en soit, cette première étape de mise au point nous a permis d'obtenir plusieurs résultats positifs, novateurs et valorisables. Chez certains témoins infiltrés, un marquage important a été retrouvé dans les espaces intercellulaires, comme attendu suite à une infiltration, où le liquide rentre par les stomates et remplit les lacunes. Ce résultats n'étant pas retrouvés pour l'intégralité des témoins infiltrés, il est possible qu'un certain niveau de stress avant l'étape d'infiltration (transport, luminosité, prélèvement,...) ait entraîné la fermeture des stomates et limité son efficacité, ou que les différentes étapes menant à l'inclusion en résine (fixation notamment), aient éliminé une partie de la laminarine. D'ailleurs, la faiblesse du marquage correspondant au dépôt de laminarine sur la cuticule,

Infiltration H11

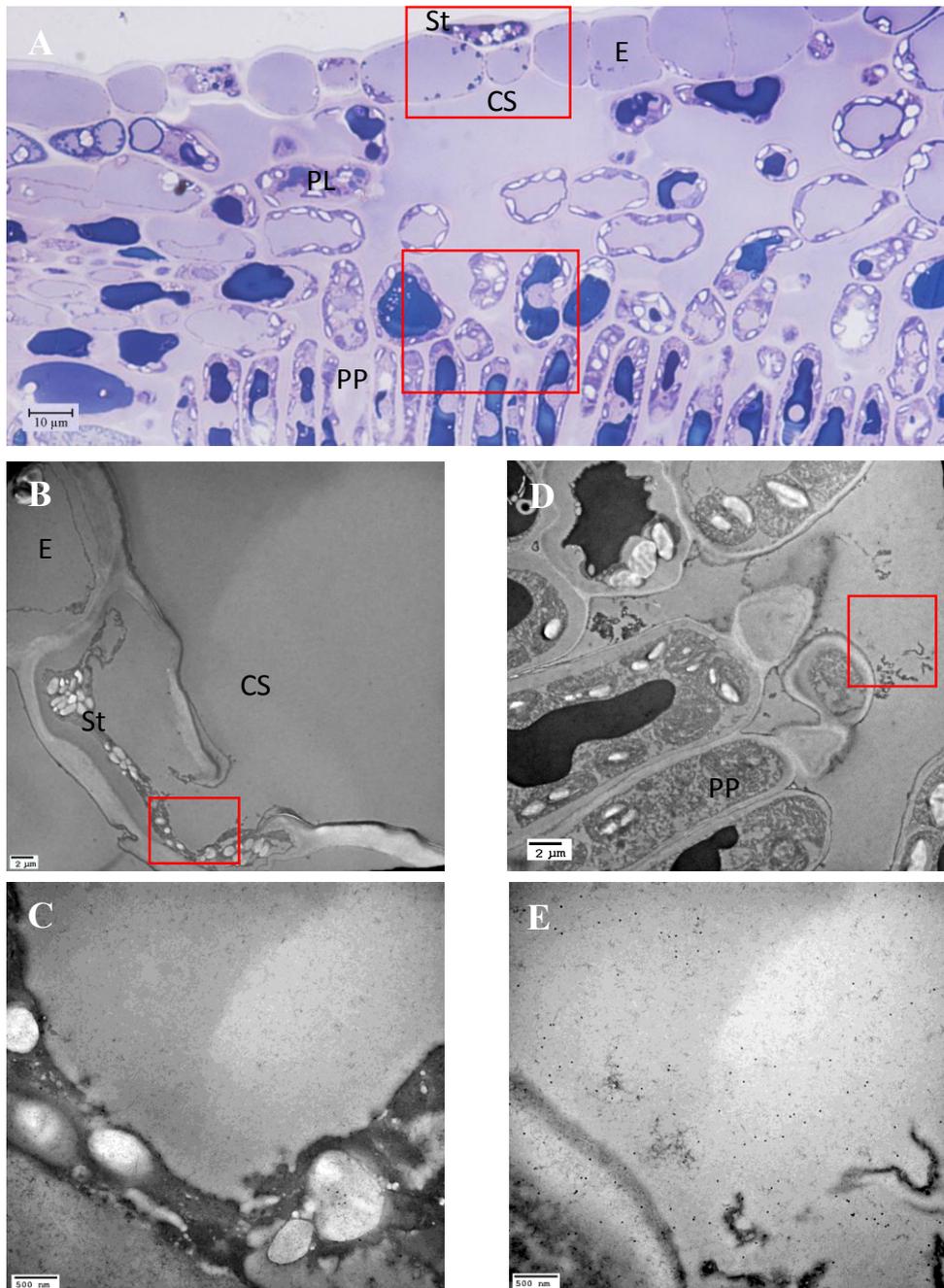


Figure 12 : Observations, en microscopie électronique à transmission (MET) après immuno-marquage, des profils de diffusion de la laminarine dans des feuilles de vigne traitées par infiltration.

A : coupes transversales semi-fines de la zone d'observation colorées au bleu de toluidine et observées en microscopie photonique, x 40 ; barre d'échelle représentant 10 µm. **B et D :** coupes transversales ultra-fines représentant la vue d'ensemble de la zone d'observation, observées en MET, X4000 ; barre d'échelle représentant 2 µm. **C et E :** observation de la zone de marquage en MET, x 30000 ; barre d'échelle représentant 500 nm. Légende : E : épiderme ; St : stomate ; CS : cavité sous-stomatique ; PL : parenchyme lacuneux ; PP : parenchyme palissadique. Les carrés rouges représentent la zone de focalisation.

à l'extérieur de la feuille (**Figure 15 C**) suggère que la laminarine aurait pu être partiellement éliminée au cours des différentes étapes précédant l'inclusion.

Selon les résultats obtenus à partir d'échantillons infiltrés, le marquage des stomates et des trachéides apparaît très peu dense. Toutefois, contrairement à un traitement classique (par pulvérisation foliaire), la laminarine n'a pas la possibilité de diffuser librement durant 48 h (l'étape de fixation ne dure que 30 min), ce qui pourrait expliquer la faible densité du marquage. Notons cependant que ce marquage apparent, bien que faible, tend à suggérer la plus grande affinité de ces structures cellulaires pour les composés hydrophiles de type PS.

Les résultats obtenus à partir des échantillons traités par dépôts, ont révélés un marquage plus important au niveau des stomates, des cellules de l'épiderme et des cellules du parenchyme lacuneux, ce qui confirme les résultats obtenus en microscopie biphotonique. Toutefois, le marquage observé dans les cellules situées autour des petits faisceaux conducteurs ne se limite pas seulement aux parois cellulaires mais s'étend au contenu cellulaire. Cette observation suggère que la laminarine pourrait également être transportée dans la cellule et emprunter de ce fait la voie symplastique. De plus, cette voie de diffusion est bien connue pour le transport de saccharose, composé carboné hydrophile, à travers la plante (Stitt, 1996). Toutefois il est très possible que pour ce faire elle soit préalablement dégradée par des β -1,3-glucanases, notamment abondantes dans la paroi cellulaire, lors de sa diffusion dans les tissus, et qu'elle circule à l'état fragmenté. Dans ce contexte, il est alors envisageable que nous tracions des oligomères de plus faible degré de polymérisation, qui correspondraient aux fragments ayant conservé l'extrémité réductrice marquée par la LRB.

Dans ces zones vascularisées, le signal est retrouvé jusque dans les éléments conducteurs du phloème et du xylème, comme Liu *et al.*, (2004b) l'ont observé pour d'autres molécules. De plus, la concordance des résultats obtenus en microscopies électronique et biphotonique montrent que les éléments conducteurs et les structures cellulaires avoisinantes, peuvent constituer une voie de diffusion pour les composés hydrophiles *in planta*. Ces résultats, novateurs, tendent à suggérer que la laminarine pourrait être transportée sur de plus longues distances que le seul site d'application, par l'intermédiaire de la sève, ce qui pourrait conférer une portée systémique au traitement facilitant par exemple la protection des organes néo-formés. Dans ces zones vascularisées, les tissus de conduction et certains tissus de soutien peuvent être particulièrement lignifiés. Cette lignification permet de rendre le tissu plus résistant à la pression exercée par la sève et lui confère également une imperméabilité qui limite les pertes en eau et régule transversalement la distribution de la sève au travers de ponctuations. Au niveau des faisceaux plus jeunes et plus fins (nervures fines notamment), il est de notoriété que la lignification est moins importante, notamment au niveau des éléments vasculaires où les trachéides les moins évoluées (annelées et spiralées) présentent des ponctuations plus étendues et seraient par conséquent possiblement plus perméables aux composés hydrophiles. Cette hypothèse pourrait expliquer les différents profils de diffusion observés entre les nervures secondaires (organisées en faisceau libéro-ligneux) et les nervures plus fines. Cependant, la résolution du microscope biphotonique (seuil de détection de la fluorescence et grossissement maximal) ne nous permet pas d'exclure que la laminarine puisse pénétrer au niveau des nervures plus épaisses et cette voie de pénétration pourrait potentiellement être identifiée en microscopie électronique.

De ce fait, il serait intéressant d'améliorer la méthode d'immuno-cytologie, ici mise au point pour l'étude de la diffusion de composés éliciteurs. Dans le cas de la laminarine la présence naturelle de β -1,3 glucanes dans les tissus végétaux (comme la callose), reconnus par l'anticorps est susceptible de biaiser l'interprétation des résultats. De plus, des travaux d'évaluation de l'AC β -1,3-glucane en ELISA rapportent que cet anticorps possède une forte spécificité avec son antigène mais une moindre sensibilité (Patathil *et al.*, 2010). Ici, l'étape d'immunologie est effectuée sur des échantillons foliaires

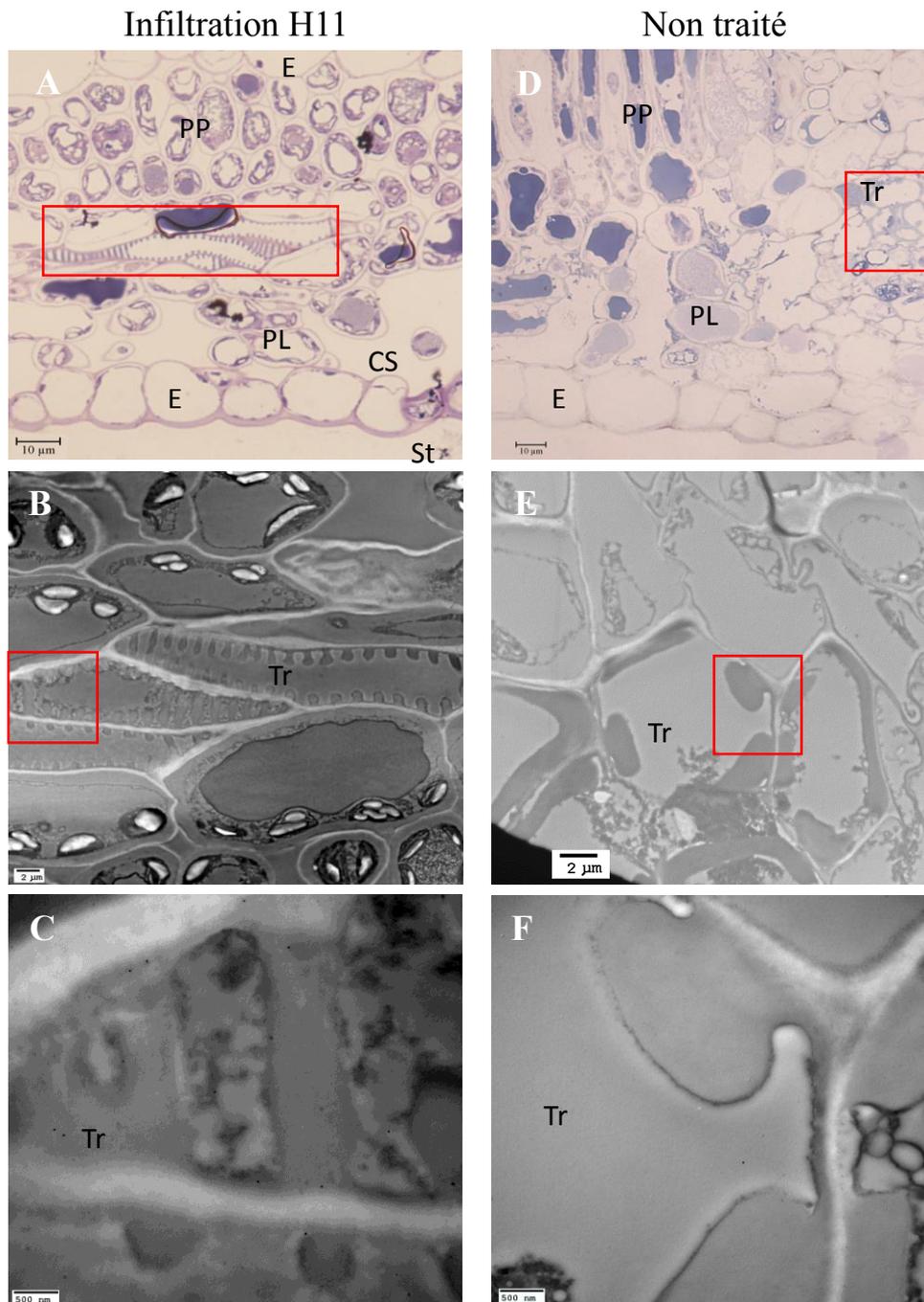


Figure 13 : Observations, en microscopie électronique à transmission (MET) après immuno-marquage des profils de diffusion de la laminarine dans des feuilles de vigne traitées par infiltration.

A-C : échantillon infiltré. **D-F** : échantillon non traité. **A et D** : coupes transversales semi-fines de la zone d'observation colorées au bleu de toluidine et observées en microscopie photonique, x 40 ; barre d'échelle représentant 10 μm . **B et F** : coupes transversales ultra-fines représentant la vue d'ensemble de la zone d'observation, observées en MET, X4000 ; barre d'échelle représentant 2 μm . **C et F** : observation de la zone de marquage en MET, x 30000 ; barre d'échelle représentant 500 nm. Légende : E : épiderme ; St : stomate ; CS : cavité sous-stomatique ; PL : parenchyme lacuneux ; PP : parenchyme palissadique ; Tr : trachéïdes. Les carrés rouges représentent la zone de focalisation.

fixés et inclus, ce qui peut encore diminuer la sensibilité de cet anticorps. Idéalement, il faudrait évaluer ce protocole sur des échantillons traités avec PS3 (dérivé sulfaté de la laminarine), ce qui permettrait de s'affranchir de l'AC β -1,3 et de possibles réactions avec la callose, les plantes terrestres ne synthétisant pas de sucres sulfatés. Cependant, la faible activité immunogène de PS3 n'a à ce jour pas permis de développer un anticorps spécifique de ce PS, malgré plusieurs tentatives.

Quoi qu'il en soit, nos résultats montrent que des PS de grandes tailles, appliqués par pulvérisation foliaire, peuvent diffuser *in planta* par l'intermédiaire des voies stomatique et très certainement transcuticulaire. Il serait potentiellement possible d'augmenter la pénétration de ces molécules en diminuant leur degré de polymérisation, leur poids moléculaire constituant certainement un frein à leur biodisponibilité, notamment pour une pénétration transcuticulaire (Schönherr, 2006). Cependant, des essais antérieurs ont démontré que les chaînes de laminarine de taille inférieure (13 résidus glucose) à la laminarine naturelle (25 unités glycosidiques) perdent leur efficacité contre le mildiou de la vigne (Allègre *et al.*, 2009).

Dans la pratique, contrairement à nos conditions d'expérimentation, les feuilles développées au vignoble sont soumises à différents stress environnementaux (U.V., vents, stress hydrique, attaques d'organismes phytopathogènes...). Par conséquent, elles ont tendance à être plus coriaces, avec des cuticules souvent plus épaisses (Berli *et al.*, 2013 ; Seo *et al.*, 2011), ce qui pourrait limiter le passage de composés hydrophiles par l'intermédiaire de la voie transcuticulaire et apoplastique. De ce fait, le traitement n'aurait pas la possibilité de diffuser aussi facilement jusque dans les petits faisceaux conducteurs, comme observé pour de jeunes feuilles de plants de vignes cultivés sous serres. Ceci limiterait donc la biodisponibilité et la systémie du signal et tendrait à rendre le traitement polysaccharidique moins efficace dans ces conditions d'application.

En revanche, nos résultats suggèrent qu'il est possible d'augmenter la biodisponibilité de ces polysaccharides par une meilleure application du traitement. En effet, même s'il est certain que l'épaisseur de la cuticule est plus importante chez des feuilles de vignoble, il est possible de favoriser la pénétration transcuticulaire en traitant en période de forte humidité, la pénétration de composés hydrophiles étant fortement dépendante de l'humidité relative et de la température de l'air (Ramsey *et al.*, 2005). En outre, étant donné le rôle important des stomates dans la pénétration des PS hydrophiles, il serait plus pertinent (i) de soigner l'application du traitement sur la face inférieure des feuilles, la vigne étant une espèce hypostome, et (ii) d'effectuer la pulvérisation foliaire de préférence tôt le matin, période durant laquelle l'ouverture stomatique et l'humidité relative sont optimales.

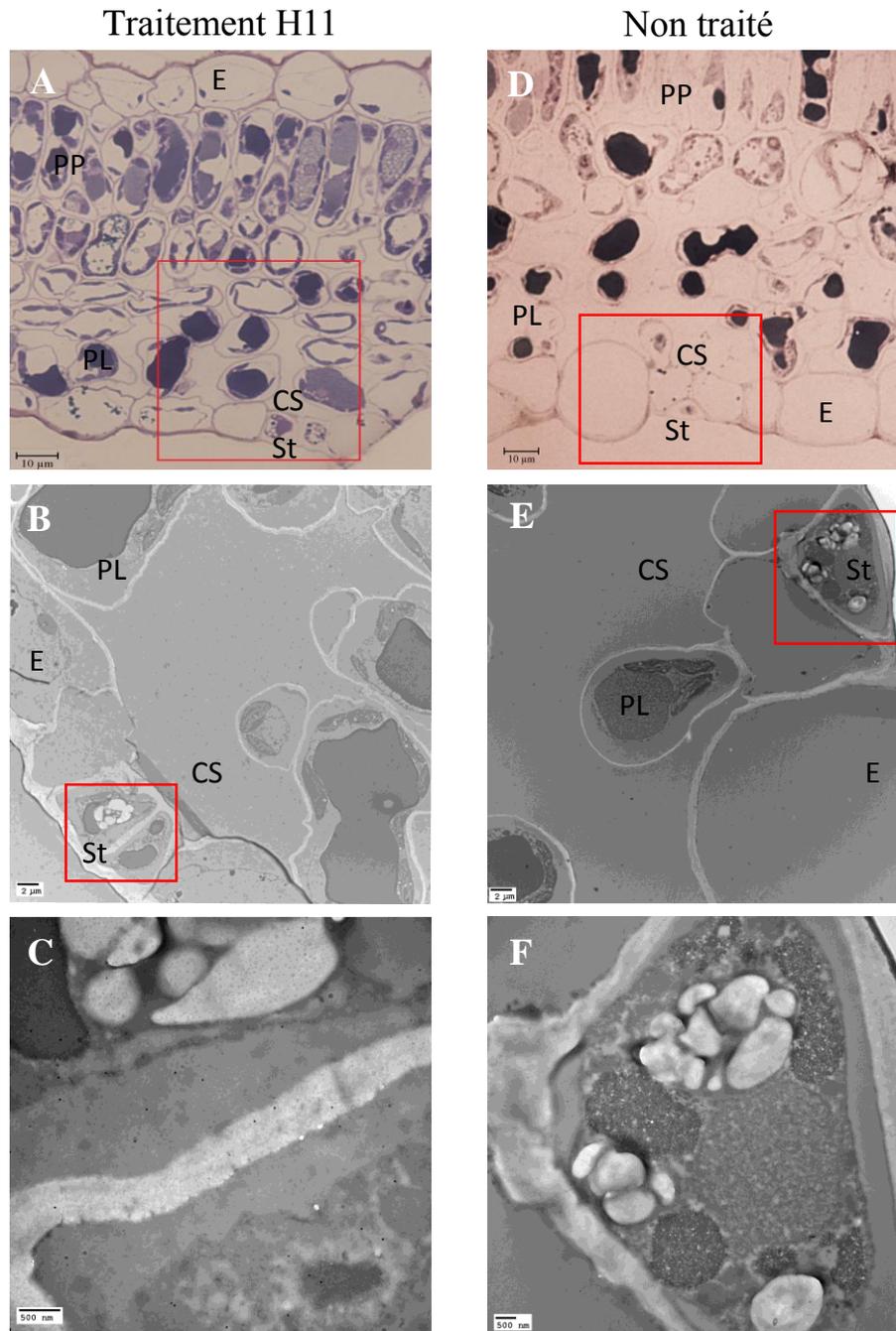


Figure 14 : Observations, en microscopie électronique à transmission (MET) après immuno-marquage, des profils de diffusion de la laminarine dans des feuilles de vigne traitées par dépôt.

A-C : échantillon traité par la laminarine et prélevé à 48 hpt. **D-F** : échantillon non traité. **A et D** : coupes transversales semi-fines de la zone d'observation colorées au bleu de toluidine et observées en microscopie photonique, x 40 ; barre d'échelle représentant 10 µm. **B et E** : coupes transversales ultra-fines représentant la vue d'ensemble de la zone d'observation, observées en MET, X4000 ; barre d'échelle représentant 2 µm. **C et F** : observations de la zone de marquage en MET, x 30000 ; barre d'échelle représentant 500 nm. Légende : E : épiderme ; St : stomate ; CS : cavité sous-stomatique ; PL : parenchyme lacuneux ; PP : parenchyme palissadique. Les carrés rouges représentent la zone de focalisation.

Bibliographie

- Allègre M (2007) Etude du rôle des stomates dans l'interaction *Vitis vinifera* – *Plasmopara viticola*. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne, Dijon.
- Anses, Laboratoire de Lyon (2012) Résistance du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) vis-à-vis des CAA et des Qil. Plan de surveillance 2012 [Disponible sur : http://draaf.pays-de-la-loire.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Anses-RPP_Bilan_Resistance_Mildiou_Vigne_Plan_de_surveillance_2012_vf_cle0abd57.pdf; consulté le 16-03-2015]
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bezier 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
- Berli FJ, Alonso R, Bressan-Smith R, Bottini R (2013) UV-B impairs growth and gas exchange in grapevines grown in high altitude. *Physiologia Plantarum* 149: 127–140
- Boller T, Felix G (2009) A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60(1):379
- Buchholz, A. (2006). Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway. *J. Exp. Bot.* 57: 2501–2513.
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11 (10), 1017-1028
- Côté F, Hahn MG (1994) Oligosaccharins: Structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* 26:1379-1411
- Dubos B (2002) Maladies cryptogamiques de la vigne : les champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne . 2^{ème} édition, Ed. Feret. pp 17-32
- Eichert T, Goldbach HE (2008) Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces – further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum* 132: 491–502
- Eichert T, Kurtz A, Steiner U, Goldbach H E (2008) Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water suspended nanoparticles. *Physiol Plant* 134: 151–160

Traitement H11

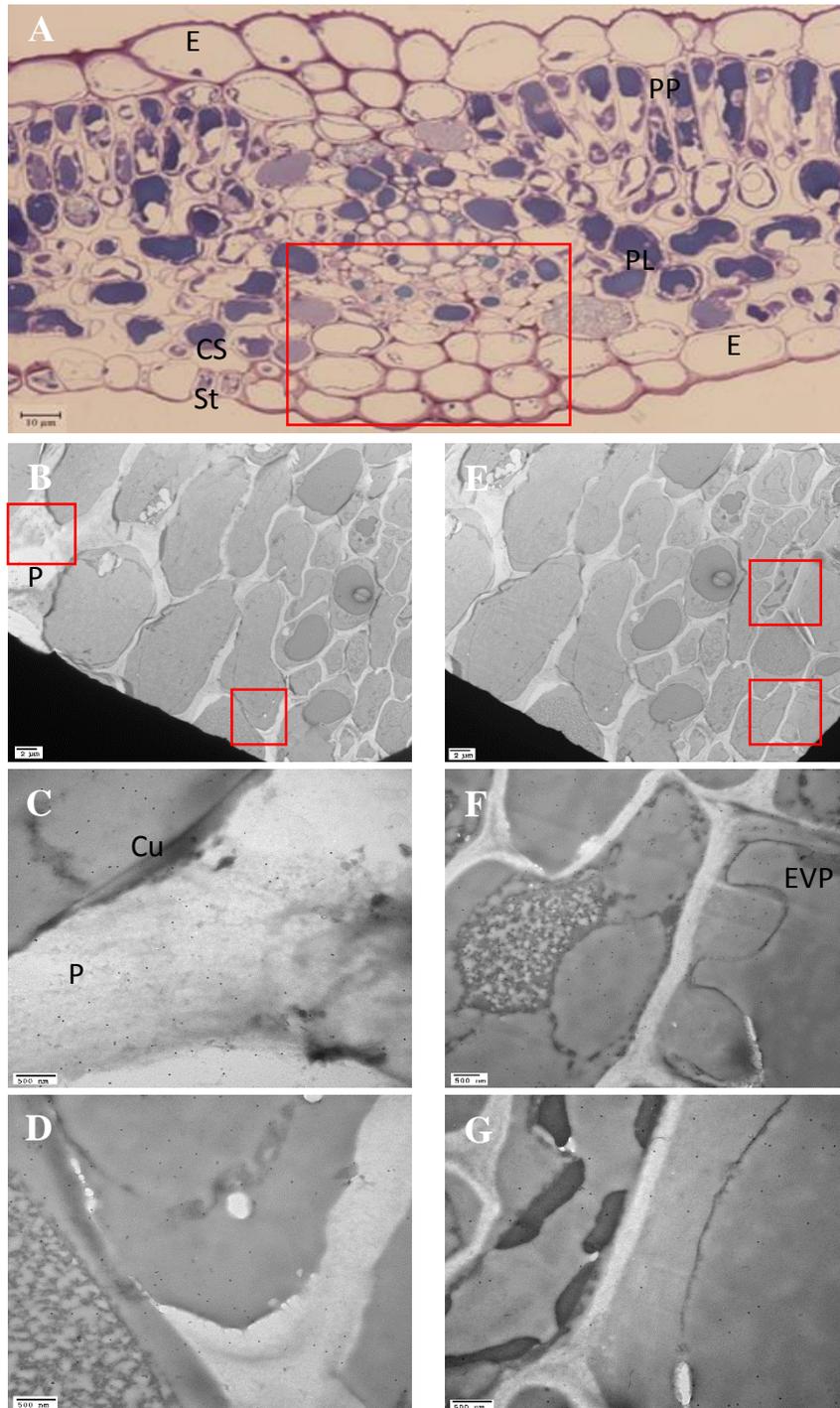


Figure 15 : Observations, en microscopie électronique à transmission (MET) après immunomarquage, des profils de diffusion de la laminarine dans des feuilles de vigne traitées par dépôt.

A : coupes transversales semi-fines de la zone d'observation colorées au bleu de toluidine et observées en microscopie photonique, x 40 ; barre d'échelle représentant 10 µm. **B et E :** coupes transversales ultra-fines représentant la vue d'ensemble de la zone d'observation, observées en MET, X4000 ; barre d'échelle représentant 2 µm. **C, D, F et G :** observation de la zone de marquage en MET, x 30000 ; barre d'échelle représentant 500 nm. Légende : E : épiderme ; St : stomate ; CS : cavité sous-stomatique ; PL : parenchyme lacuneux ; PP : parenchyme palissadique ; Cu : cuticule ; P : paroi ; EVP : éléments vasculaires du phloème. Les carrés rouges représentent la zone de focalisation.

- E-phy. Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France [Disponible sur : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>, consulté le 20-03-2015]
- Fernández V, Eichert T (2009) Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: Current State of Knowledge and Perspectives of Foliar Fertilization, *Critical Reviews in Plant Sciences* 28:1-2, 36-68
- FranceAgriMer (2013) La filière en bref : la production de vin en 2013, le marché du vin en 2013. [Disponible sur http://www.franceagrimer.fr/filiere-vin-et-cidriculture/Vin/La-filiere-en-bref/La-production-de-vin-en-2013#eztoc283219_0_1, consulté le 13-03-2015]
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:711-24
- Goodwin SM, Jenks MA (2005) Plant cuticle function as a barrier to water loss. *Plant Abiotic Stress* Edited by Jenks MA, Hasegawa PM. Blackwell Publishing, Inc.
- Huglin P, Schneider C (1998) *Biologie et écologie de la vigne*. Paris, Lavoisier. 370 p
- Krzyżaniak Y (2014) Etude de la biodisponibilité d'oligosaccharides éliciteurs dans les tissus foliaires en vue de l'amélioration de leur efficacité contre le mildiou. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome
- Liu ZQ, Gaskin RE, (2004b) Visualisation of the uptake of two model xenobiotics in bean leaves by confocal laser scanning microscopy: diffusion pathways and implication in phloem translocation. *Pest Manag Sci* 60:434–439
- Liu ZQ, Gaskin RE, Zabkiewicz JA (2004a) Visualization of the effect of surfactant on the uptake of xenobiotics into plant foliate by confocal laser scanning microscopy. *Weed Res* 44:237–243
- Meikle PJ, Bonig I, Hoogenraad NJ, Clarke AE, Stone BA (1991) The location of (1→3)- β -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1→3)- β -glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185: 1-8
- Ménard R, Alban S, de Ruffay P, Jamois F, Franz G, Fritig B, Yvin JC, Kaufmann S (2004) β -1,3 Glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (11):3020-3032
- Ministère de l'agriculture et de la pêche (2008) Plan écophyto 2018 de réduction des usages de pesticides 2008-2018. [Disponible sur : http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/PLAN_ECOPHYTO_2018-2-2-2_cle8935ee.pdf ; consulté le 16-03-2015]

- Paris F, Krzyżaniak Y, Gauvrit C, Jamois F, Domergue F, Joubes J, Ferrieres V, Adrian M, Legentil L, Daire X, Trouvelot S (2015) Surfactant: a key to enhancing bioavailability and efficacy of polysaccharidic resistance inducers. Soumis le 30 juillet 2015
- Pattathil S, Avci U, Baldwin D, Swennes AG, McGill JA, Popper Z, Bootten T, Albert A, Davis RH, Chennareddy C, Dong R, O’Shea B, Rossi R, Leoff C, Freshour G, Narra R, O’Neil M, York WS, Hahn MG (2010) A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. *Plant Physiol* 153, 514–525
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308–316
- Rabea EI, El Badawy MT, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W (2003) Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4:1457–1465
- Ramsey RJL, Stephenson GR, Hall JC (2005) A review of the effects of humidity, humectants, and surfactant composition on the absorption and efficacy of highly water-soluble herbicides. *Pesticide Biochem Physiol* 82: 162–175
- Reignault P (2013) Etat de l’art sur les stimulateur des défenses des plantes (SDP). Colloque Elicitra – Avignon – 13 & 14 Juin 2013
- Roche P, Debelle F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Denarie J, Prome JC (1991) Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67 1131–1143
- Schönherr J (2006). Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J. Exp. Bot.* 57: 2471–2491
- Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt RM (2005) Plant–microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* 166: 589–594
- Seo PJ, Lee SB, Suh MC, Park MJ, Go YS, Park CM (2011) The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *PlantCell* 23, 1138–1152
- Smeekens S, Ma J, Hanson J, Rolland F (2010) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol* 13, 274–279
- Steimetz E, Trouvelot S, Gindro K, Bordier A, Poinssot B, Adrian M, Daire X (2012) Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 89–96

- Stitt M (1996) Plasmodesmata play an essential role in sucrose export from leaves: a step toward an integration of metabolic biochemistry and cell biology. *Plant Cell* 8:565–71
- Stock D, Holloway PJ (1993) Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. *Pestic Sci* 38: 165–177
- Trouvelot S, Varnier AL, Allègre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert JM, Pugin A, Daire X (2008) A β -1,3 Glucan Sulfate Induces Resistance in Grapevine against *Plasmopara viticola* Through Priming of Defense Responses, Including HR-like Cell Death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 232–243
- Tsuda K, Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 13:459–65
- Walters DR, Ratsep J, Havis ND (2013) Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J Exp Bot* 64,1263–1280
- Wong F, Burr H, Wilcox W (2001) Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* 50:427-432