

Conception et réalisation d'une enceinte à usage unique pour la production de spores de mildiou sur plantes de vigne

Marie-Annick Dorne¹, Sabine Wiedemann-Merdinoglu¹

Didier Merdinoglu¹

Résumé. Quatre prototypes d'enceinte ont été comparés pour évaluer la production de spores d'un bioagresseur sur plantes entières. Le modèle biologique retenu est le mildiou de la vigne, provoqué par un Oomycète, *Plasmopara viticola*. Cet agent pathogène est un parasite obligatoire qui a besoin de sa plante-hôte pour réaliser son cycle d'infection et produire, durant sa phase végétative, des spores asexuées. La production de spores requiert une hygrométrie supérieure à 90 %. Afin d'assurer le maintien de ce taux d'humidité pendant la durée du cycle d'infection, nous avons conçu et fait réaliser une enceinte à usage unique pouvant être utilisée dans les conditions contrôlées de laboratoire. Elle est constituée par une structure en carton fermée hermétiquement par un sac plastique et dans laquelle sont placées des plantes de vigne préalablement infectées par une suspension de spores. Ces plantes sont dites jetables car produites et dédiées uniquement à cet effet. Selon le prototype de la structure et après une période d'incubation en chambre climatique, des spores sont produites en quantité plus ou moins abondante. La conception et la réalisation de cette structure en carton répondent à un cahier des charges défini avec l'entreprise qui a concrétisé ce projet. Le prototype retenu donne entière satisfaction en terme de résistance à l'humidité et d'efficacité pour la production de spores. Ce type d'enceinte de petite dimension pouvant accueillir jusqu'à une quinzaine de plantes a l'avantage d'être à usage unique, ne nécessitant aucune désinfection et pouvant être autoclavée après utilisation. Elle permet de multiplier simultanément plusieurs souches du pathogène. Elle pourrait ainsi convenir à la production d'autres microorganismes sur plantes ou à la réalisation de tests de pouvoir pathogène sur plantes entières.

Mots clés : *Plasmopara viticola*, inoculation en conditions contrôlées, mildiou, vigne, production d'inoculum

Introduction et contexte

La thématique principale de l'équipe Génétique et Amélioration de la Vigne de l'Inra de Colmar est la création de variétés de vigne durablement résistantes aux maladies foliaires d'origine fongique. L'inventaire de sources de résistance réalisé à partir de collections ampélographiques et l'étude du déterminisme génétique de la résistance de sources ainsi identifiées, nécessitent d'évaluer avec précision un grand nombre de plantes pour leur niveau de résistance (Wiedemann-Merdinoglu et al., 2011). L'une des maladies les plus préjudiciables de la vigne est le mildiou causé par un oomycète, *Plasmopara viticola*. Ce bioagresseur est un parasite obligatoire ; il réalise tout son cycle d'infection sur

¹ UMR SVQR, Santé de la Vigne et Qualité du Vin, Inra, UDS, 28 Rue de Herrlisheim, 68021 Colmar, France
marie-annick.dorne@inra.fr
sabine.merdinoglu-wiedemann@inra.fr
didier.merdinoglu@inra.fr

sa plante-hôte et produit, pendant sa phase végétative, des spores asexuées (sporanges) à la surface abaxiale des feuilles. Afin d'étudier la résistance de la vigne au mildiou, des tests de phénotypage sont réalisés en conditions contrôlées de laboratoire sur une plateforme de phénotypage (Merdinoglu et Poulet, 2012). Cette étape consiste à appliquer artificiellement sur des disques foliaires maintenus en survie dans des plaques à puits, un inoculum constitué d'une suspension de spores. Après incubation des disques inoculés, les symptômes de la maladie (sporulation et nécrose) sont quantifiés directement par observation visuelle et/ou analyses (quantification de spores, quantification de la biomasse du mycélium, analyse d'image) des disques inoculés.

Pour réaliser le phénotypage, l'agent pathogène a besoin d'être multiplié au préalable sur sa plante-hôte afin de produire un nombre important de spores et pour pouvoir ainsi constituer un inoculum efficace. La durée du cycle d'infection est de 5 à 6 jours en conditions optimales de température et de lumière (21°C, 100 µE). Toutefois, la production de spores est dépendante d'une hygrométrie supérieure à 90%, pendant toute la phase du cycle. Le maintien de ce taux d'humidité est assuré au laboratoire par une enceinte en carton enveloppée dans un sac plastique, l'ensemble étant à usage unique.

Dans cette enceinte est placé le matériel végétal destiné à la multiplication de l'agent pathogène. Ce matériel végétal est produit en serre et est constitué de plantes âgées de deux mois, issues de la germination de pépins de la variété sensible Muscat Ottonel.

Cet article présente la conception et l'évaluation de quatre prototypes d'enceintes à usage unique pour produire une grande quantité de spores aériennes d'un parasite obligatoire sur plantes vivantes. Cette technique originale permet par ailleurs d'individualiser chaque souche du bioagresseur, afin de prévenir tout mélange de souches.

Matériel et Méthodes

Description des étapes de production d'inoculum de *Plasmopara viticola*

Les enceintes que nous avons conçues sont destinées à mettre en œuvre le protocole décrit ci-dessous.

Une structure en carton, constituant l'enceinte emballée dans un sac plastique en polyéthylène translucide (PEBD), est utilisée pour réaliser l'incubation de jeunes plantes préalablement inoculées. Celles-ci sont employées pour multiplier le bioagresseur et aboutir ainsi à une production abondante de spores de *P. viticola* qui seront utilisées comme inoculum pour les tests ultérieurs de phénotypage à grande échelle.

Ces jeunes plantes sont obtenues à partir de la germination de pépins de la variété sensible Muscat Ottonel. Deux mois de croissance en serre en conditions semi-contrôlées sont requis après le stade de deux cotylédons pour atteindre le stade de six feuilles. Les plantes dont la hauteur est de 30 cm environ, sont ensuite apportées au laboratoire, puis disposées dans l'enceinte placée dans un poste protégé. Ces plantes sont dites « jetables » car elles sont produites uniquement dans l'objectif de multiplier l'agent pathogène et ne sont utilisées qu'une seule fois. Après utilisation, elles sont compactées directement dans l'enceinte, afin d'être autoclavées avant destruction.

La **Figure 1** présente les différentes étapes de la production d'inoculum pour les tests de phénotypage

- Chaque souche est conservées sous forme de feuilles sporulantes congelées. Des feuilles sporulantes sont mises dans un récipient contenant de l'eau stérile (1).
- Le récipient fermé est ensuite agité manuellement afin de libérer les spores des feuilles et constituer une suspension de spores dénommée « inoculum » (2, 5).

Après estimation de la concentration en spores de cette suspension à l'aide d'une cellule de comptage, la concentration de celle-ci est ajustée à environ 1.10^5 spores/mL et la suspension est appliquée par pulvérisation (3) sur la surface abaxiale des feuilles des jeunes plantes à l'aide d'un sprayer Preval (Preval, les Noelles, 79160 Fenioux), constitué d'un flacon en verre de 150 mL et d'une réserve de gaz (94 mL). Après l'inoculation, le sac plastique est fermé hermétiquement afin de conserver un niveau maximal d'hygrométrie. Ces actions sont réalisées sous une hotte à flux laminaire vertical.

- L'enceinte contenant les plantes inoculées est alors placée dans une chambre climatique dont la température (21°C), la luminosité (100 μ E) et la photopériode (16 h jour - 8 h obscurité) sont optimales pour le déroulement du cycle du mildiou.
- Après une période d'incubation de six jours, l'ensemble est sorti de la chambre climatique pour être ouvert sous la hotte à flux laminaire (4).
- Les feuilles sporulantes sont récoltées manuellement et sont utilisées pour produire un nouvel inoculum destiné i) soit à réaliser les tests de phénotypage (5, 6), ii) soit à conserver la souche sous forme de feuilles infectées et congelées (7).
- L'enceinte en carton, le sachet plastique et le reste des plantes sont ensuite compactés manuellement, puis emballés dans un sac à autoclave pour être stérilisés à l'autoclave avant d'être jetés (8).

Figure 1 page suivante

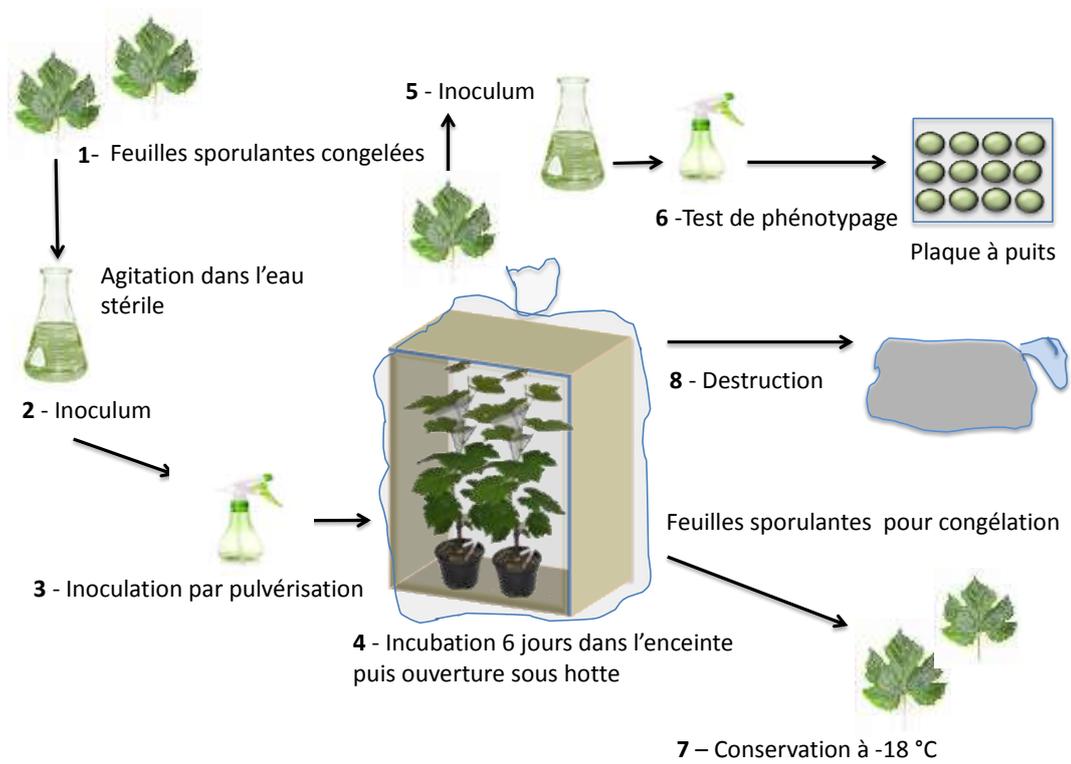


Figure 1. Préparation d'inoculum de *Plasmopara viticola* pour la production de spores.

Description du matériel constituant la structure de l'enceinte

Pour réaliser la structure de l'enceinte, notre choix s'est porté sur du carton recyclé. C'est un matériau peu onéreux, léger, facile à manipuler, pouvant être plié, écrasé et mis dans un sac à autoclave.

Choix du partenaire

Pour concrétiser ce projet, nous avons contacté plusieurs entreprises locales de cartonnage ; deux entreprises ont répondu à notre demande, Carton Design (<http://www.mairie.biz/entreprise-carton-design-110190.html>) et la société Cartonnage de Colmar (<http://www.smurfitkappa.com/vhome/fr/colmar/Pages/Default.aspx>).

La société Cartonnage de Colmar a soutenu notre projet et nous a accompagnés jusqu'à la réalisation finale de celui-ci.

Cahier des charges

Le cahier des charges a été défini en tenant compte des contraintes de dimensions des installations dans lesquelles l'enceinte devait pouvoir être placée, des contraintes biologiques de survie des plantes et de sporulation de l'agent pathogène et de la nécessité d'autoclavage. Les contraintes identifiées ont été les suivantes :

- dimensions de la hotte à flux laminaire verticale : L 1450 × l 460 × h 710 mm ;
- ouverture de la vitre frontale : h 480 mm ;
- dimensions d'un niveau de la chambre climatique : L 1320 × l 600 × h 690 mm ;
- six enceintes doivent être placées dans chaque chambre climatique sur 2 niveaux ;
- passage de la lumière pour la survie des plantes pendant l'incubation ;
- quantité optimale de plantes pouvant être traitée par enceinte : 12 plantes ;
- plantes poussant dans des cubes de laine de roche de dimension 75 x 75 mm ;
- hauteur moyenne des plantes âgées de 2 mois : 380 mm ;
- résistance du carton à l'humidité : durée maximum de 10 jours ;
- hygrométrie à l'intérieur de l'enceinte > 90 % ;
- facilité de mise en œuvre : pliage en moins de 2 min ;
- dimensions d'un plateau pour porter l'enceinte : L 590 x l 360 x h 70 mm ;
- dimension d'un sac plastique : L 1450 x l 600 mm ;
- absence de développement de saprophytes sur le carton ;
- présence d'une condensation sur les parois du sac plastique ;
- sporulation abondante du mildiou sur la face abaxiale des feuilles inoculées ;
- compression facile afin d'être autoclavé.

Résultats

Paramètres d'évaluation

Plusieurs prototypes de structure en carton ont été élaborés. Les prototypes différaient selon leurs formes et leurs dimensions. Ils présentaient tous des ouvertures latérales sur les quatre faces afin de laisser passer un maximum de lumière pour permettre la survie des plantes.

Au final, quatre prototypes différents ont été évalués dans les conditions réelles de production de spores. Douze plantes préalablement infectées y ont été déposées ; des conditions d'humidité saturante ont été obtenues par pulvérisation d'eau dans l'enceinte avant la fermeture du sachet plastique. Après fermeture, l'ensemble a été placé dans la chambre climatique pendant une durée de 6 jours.

Au terme de cette période, les prototypes ont été classés selon les paramètres suivants : la résistance du carton à l'humidité (tenue et état), la présence de condensation sur les parois du sac plastique transparent, la production de spores de *P. viticola* sur la face abaxiale des feuilles infectées, l'absence de développement de saprophytes sur le carton.

Ces paramètres ont été évalués à l'aide d'une grille de notation constituée de quatre classes, allant de A0 à A3 : A0 - très mauvais, A1 – mauvais, A2 – bon, A3 - très bon

Présentation et évaluation des quatre prototypes

Prototype 1 : L 620 × l 450 × h 400 mm

Ce prototype a été réalisé avec de larges ouvertures pour laisser passer le plus de lumière possible. Il était constitué d'un socle inférieur et de quatre montants. Après quatre jours dans la chambre climatique, les côtés se sont affaissés et le plastique s'est effondré sur les plantes. La conception de ce prototype n'a pas permis une tenue parfaite de la structure pendant la durée de l'essai. Par ailleurs, les dimensions de cette enceinte étaient trop grandes, quelques saprophytes ont été observés sur le carton et l'agent pathogène a très peu sporulé sur les feuilles inoculées.



Critères	Note
Tenue	A1
Condensation	A1
Etat du carton	A0
Sporulation du mildiou	A0
Saprophytes sur le carton	A2

Figure 2. Caractéristiques du prototype 1. A gauche, forme de la structure en carton. A droite, notes des 5 critères (A0 : très mauvais, A1 : mauvais, A2 : bon, A3 : très bon) (photo : M.A. Dorne).

Prototype 2 : L 300 × l 320 × h 400 mm

Ce prototype était un parallélépipède rectangle avec quatre ouvertures sur le côté et une sur le dessus. Il a été conçu avec un socle inférieur et un socle supérieur permettant de tenir les quatre montants. Il était plus petit mais beaucoup plus solide au montage que le modèle précédent. Il a permis de bien positionner et de tendre le sac plastique sur l'enceinte afin d'éviter que celui-ci ne s'affaisse sur les plantes. La tenue et l'état de l'ensemble était bonne. Toutefois, la taille étant petite, cette enceinte n'a permis de tester que six plantes. La sporulation était faible et des saprophytes ont été observés sur le carton.



Critères	Note
Tenue	A2
Condensation	A1
Etat du carton	A3
Sporulation du mildiou	A1
Saprophytes sur le carton	A1

Figure 3. Caractéristiques du prototype 2. A gauche, forme de la structure en carton. A droite, notes des 5 critères (A0 : très mauvais, A1 : mauvais, A2 : bon, A3 : très bon).

Prototype 3 : L 500 × l 325 × h 440 mm

Ce prototype reprend la conception du prototype 1 avec des montants avant et arrière joints entre eux afin de rigidifier l'ensemble. Ce prototype n'a pas résisté à l'humidité et s'est effondré après cinq jours. La sporulation était faible. Toutefois, très peu de saprophytes ont été observés sur le carton.



Critères	Note
Tenue	A0
Condensation	A1
Etat du carton	A0
Sporulation du mildiou	A1
Saprophytes sur le carton	A3

Figure 4. Caractéristiques du prototype 3. A gauche, forme de la structure en carton. A droite, notes des 5 critères (A0 : très mauvais, A1 : mauvais, A2 : bon, A3 : très bon) (photo : M.A. Dorne).

Prototype 4 : L 500 × l 325 × h 440 mm

Ce prototype reprend le concept du prototype 2 avec les dimensions du prototype 3. Il présente une ouverture sur le devant sans rebord, afin de mettre facilement les plantes en place.

La tenue de l'enceinte a été parfaite pendant toute la période de l'essai, la condensation sur le plastique était bien visible, l'état du carton était bon et la sporulation excellente. Quelques saprophytes ont été observés sur le carton. En raison de sa robustesse et de ses dimensions, ce prototype a été adopté comme étant le prototype final.



Critères	Note
Tenue	A3
Condensation	A3
Etat du carton	A3
Sporulation du mildiou	A3
Saprophytes sur le carton	A2

Figure 5. Caractéristiques du prototype 4. A gauche, forme de la structure en carton. A droite, notes des 5 critères (A0 : très mauvais, A1 : mauvais, A2 : bon, A3 : très bon) (photo : M.A. Dorne).

Traitement du carton à la paraffine

Pour résoudre le problème de développement de saprophytes sur le fond de l'enceinte, une enduction du carton à la paraffine végétale a été mise en place lors de la production de l'enceinte, lui donnant ainsi une meilleure rigidité à humidité. Les mêmes tests que précédemment ont été réalisés avec cette version du prototype (**Figure 5**). Aucun développement de saprophytes n'a été observé.

Caractéristiques techniques de l'ensemble

Lors de la fabrication du carton, deux feuilles de papier cannelé intercalées sont collées à la farine de manioc mélangée à de l'eau. Ce mélange, déposé sur les sommets des cannelures, se gélatinise sous l'effet de la chaleur et assure l'assemblage des papiers. Ce carton est composé de 25 % de fibres neuves provenant des déchets de scieries, principalement de coupes d'entretien des forêts et de 75 % de fibres recyclées.

Le carton est traité à la paraffine végétale, dérivés d'huiles végétales. Il est ensuite découpé selon le plan 1 de la **Figure 6**.

Dimensions de l'enceinte mise à plat : L 1690 × l 78 mm

Dimensions de l'enceinte mise à plat : L 1690 × l 78 mm

Le coût unitaire de cette structure est de 11,3 € (prix HT).

Pliage de la structure en carton

Les différentes étapes à réaliser pour passer d'une structure à plat à une enceinte montée sont présentées dans la **Figure 6** :

(1) structure à plat, (2) plier les quatre côtés, (3) rentrer les pattes, (4) plier le fond, (5) fixer le fond, (6) plier le haut, (7 et 8) rabattre les côtés, (9 et 10) la structure montée.

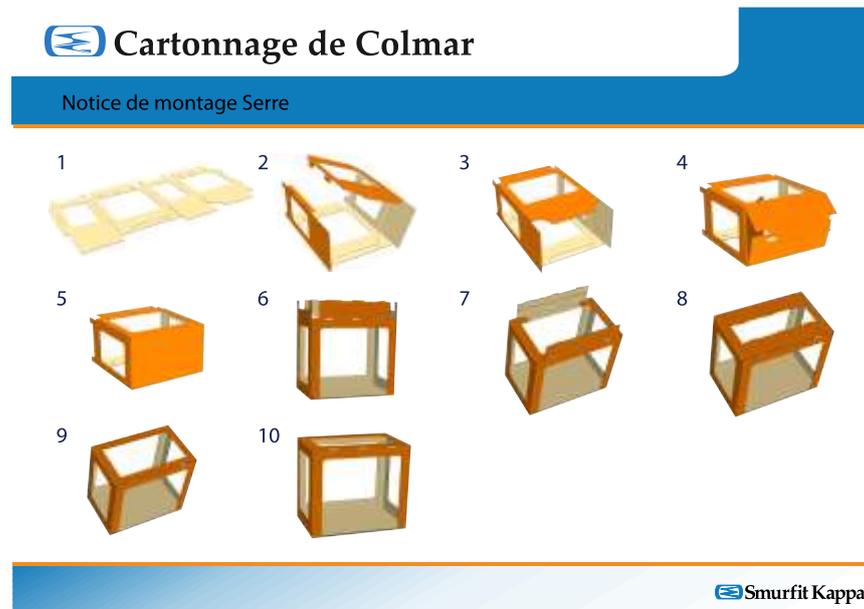


Figure 6. Montage de l'enceinte.

Bilan de phénotypage pour les quatre dernières années

Entre 2014 et 2017, le phénotypage d'environ 10 000 plantes a été réalisé lors d'une centaine d'expérimentations grâce à l'inoculum de *P. viticola* produit dans ces enceintes à usage unique (**Tableau 1**). En 2017, environ 1000 plantules jetables de Muscat Ottonel ont été produites et plus de la moitié ont été inoculées dans ces enceintes afin de multiplier le mildiou. Les spores produites ont permis l'inoculation de 9663 disques foliaires pour des tests de phénotypage (selon les protocoles de chaque expérimentation, entre 3 et 12 disques sont produits par feuille). Selon les années, une trentaine à une soixantaine d'enceintes ont été utilisées pour produire des spores de mildiou de diverses souches simultanément, sans avoir aucun problème de contaminations entre elles.

Tableau 1. Effectifs des expérimentations entre 2014 et 2017

Année	2014	2015	2016	2017
Nombre d'enceintes utilisées pour la réalisation des expérimentations	42	33	62	44
Nombre de plantes jetables utilisées pour produire de l'inoculum	504	396	744	528
Nombre d'expérimentations	30	29	25	16
Nombre de plantes expérimentales testées	3819	2485	1741	1721
Nombre de disques foliaires inoculés	17572	12520	7966	9663

Conclusion

Notre étude, menée en collaboration avec une entreprise de cartonnage, a abouti au choix d'un prototype d'enceinte à usage unique, particulièrement performant pour produire en masse les spores asexuées de *P. viticola*, en conditions contrôlées. De plus, l'induction à la paraffine de la structure en carton a évité tout développement d'organismes saprophytes indésirables.

Après cinq années d'utilisation, nous pouvons conclure que l'emploi de carton pour la fabrication de l'enceinte est totalement adapté à la production de spores de mildiou en quantité importante sur des plantes jetables (**Figure 7**).

La simplicité de montage et l'utilisation pratique et efficace de cette enceinte permet de gagner du temps et de rentrer dans une démarche de qualité et environnementale. La désinfection à l'aide de procédés chimiques n'est plus envisagée car l'enceinte n'est utilisée qu'une seule fois puis est compactée pour être stérilisée à l'autoclave avant d'être jetée.

D'autres utilisations ont été identifiées au laboratoire ou en serre. Cette enceinte est employée occasionnellement en serre pour la production de boutures herbacées de vignes et pour l'agro-infiltration de tabacs. Elle peut convenir après quelques adaptations éventuelles comme, un carton plus épais (triple cannelures TC), un traitement par Hot melt (film plastique adhésif) à d'autres cultures et d'autres agents pathogènes obligatoires. Son usage pourrait également s'élargir à d'autres applications de recherche concernant des agents pathogènes non obligatoires. Ainsi, il est tout à fait envisageable d'employer ces enceintes pour tester individuellement, sur plantes entières, le pouvoir pathogène de nombreuses souches d'un bioagresseur aérien, en évitant ainsi tout mélange entre elles. Ce type d'enceinte peut aussi donner la possibilité d'évaluer, sur plantes entières et avec plusieurs souches, l'action de différentes substances (stimulateurs de défense des plantes, produits ou agents de biocontrôle), sans risque de contamination croisées entre souches.

Figure 7 page suivante



Figure 7. Enceinte dans la chambre climatique (photo M.A. Dorne).

Références bibliographiques

Wiedemann-Merdinoglu S, Dumas V, Coste P, Dorne MA, Duchêne E, Mestre P, Merdinoglu D (2011) Development of a phenotyping platform to assess grapevine resistance to downy and powdery mildew. Poster. 2nd International Plant Phenotyping Symposium. Jülich, Germany, 5-7 September 2011, p.93. https://www.plantphenotyping.org/lw_resource/datapool/items/item_252/2ipps_2011_book_of_abstracts.pdf

Merdinoglu D, Poulet L (2012) Dossier de presse "Résistance de la vigne aux maladies : Inauguration d'une plateforme de phénotypage". <https://www6.colmar.inra.fr/svqv/content/download/3262/33176/version/2/file/Dossier%20de%20presse%20-%20VEGOIA.pdf>

Remerciements

Nous remercions le personnel des serres qui tout au long de l'année produisent et suivent nos plantes : Guillaume Denis-Semlat, Denise Hartmann, Charlotte Knichel, Sylvain Michel, Christian Vivant, Thiebault Wininger et Jacky Misbach ainsi que Pascale Coste-Heinrich qui a participé au démarrage de ce projet.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'INRA », la date de sa publication et son URL).