



Effets de l'eutypiose sur des feuilles de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Etude cytologique

par

I. PHILIPPE¹), J. FALLOT¹), M. PETITPREZ¹) et R. DARGENT²)

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Institut National Polytechnique, Toulouse, France

²) Laboratoire de Cryptogamie, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Effects of *Eutypa dieback* on the leaves of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Cytological studies

S u m m a r y : The fungus *Eutypa lata* only grows in lignified wood (trunk and arms) and causes at a distance typical symptoms on the leaves of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, a very sensitive variety. For the first time, lesions induced *in vivo* in leaf cells were examined by transmission electron microscopy. The main alterations of ultrastructure are depending on the level of disease.

In the cells of slightly affected leaves, the enlarged chloroplasts show dilated thylakoïds with a lowered electron density and sometimes contain very large starch grains. In the severely affected leaves, the cells are completely disorganized, with plasmalemma retraction, chloroplast degradation, cytoplasm lysis and endomembrane breakdown.

These results suggest that structural decline of the photosynthetic system can be responsible, at least partly, for the death of Cabernet Sauvignon grapevines.

Key words : *Eutypa lata*, fungus, disease, leaf, cell, chloroplast, plasmalemma, ultrastructure, cytology.

Introduction

Depuis l'identification d'*Eutypa lata* sur la vigne en 1973 (CARTER et PRICE), ce champignon ascomycète, responsable de la maladie de l'eutypiose, provoque de graves dommages dans les vignobles du monde entier.

Il n'existe pas de molécule permettant une lutte curative contre ce parasite; seules des mesures prophylactiques et préventives peuvent être prises afin de limiter l'extension de la maladie (DUBOS *et al.* 1989). Améliorer la connaissance de la relation entre la vigne et *E. lata* est donc indispensable. C'est pourquoi, l'étude des mécanismes d'action du champignon et de défense de la plante hôte a été entreprise en vue de la sélection de clones tolérants (FALLOT *et al.* 1990).

L'agent pathogène attaque exclusivement le tronc et les bras des ceps et n'a jamais été observé dans les rameaux herbacés et les organes qu'ils portent (BERNARD et MUR 1986). Cependant, après 3 à 10 ans d'incubation, les tiges se développent faiblement, les feuilles restent petites, jaunissent, et dès leur étalement, présentent des nécroses réparties sur toute leur surface. Les inflorescences se dessèchent, un bras dépérit et le cep meurt. La localisation limitée du mycélium et la généralisation des symptômes dans tout l'appareil aérien nous ont conduit à envisager deux approches, l'une biochimique, l'autre cytologique.

Ainsi, en collaboration avec R. TABACCHI (Neuchâtel, Suisse), nous avons repris les travaux de RENAUD (1985) qui avait isolé plusieurs composés du milieu de culture d'*E. lata*; certains d'entre eux entraînaient le flétrissement des plantules de tomate. Il a été possible de montrer qu'une de ces substances est toxique pour la vigne (TEY-RULH

1988); appliquée à des systèmes simplifiés tels que les feuilles excisées de vitroplants de Cabernet Sauvignon, elle reproduit certains des symptômes de la maladie: elle a été appelée «Eutypine». Toujours présente dans les ceps malades, cette toxine est absente des ceps sains (PHILIPPE 1991; TEY-RULH *et al.* 1991).

Une deuxième approche, cytologique, a consisté à rechercher les cibles cellulaires du champignon. Compte-tenu de l'apparition précoce de nécroses sur les jeunes feuilles, peu après le débourrement, et de l'importance de l'appareil photosynthétique, la feuille de cep atteint a été retenue comme organe d'étude de l'ultrastructure. L'objectif était de rechercher sur cet organe l'effet *in situ* du champignon localisé à distance à la périphérie de la (des) nécrose(s) du tronc.

Cet article résume les principaux résultats de l'étude par microscopie électronique à transmission de feuilles de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, prélevées dans le vignoble.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Des souches de *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, cultivées à Blanquefort (Domaine de la Chambre d'Agriculture de Bordeaux) sont utilisées comme source de matériel végétal. Des feuilles sont prélevées sur des souches saines et sur des souches présentant des symptômes faibles ou prononcés d'eutypiose (ces souches portent respectivement les notes 0, 2 et 4 de la grille de notation eutypiose 1991 établie par le Service de la Protection des Végétaux). L'échantillonnage a lieu en juin, pendant la période où les symptômes sont les plus marqués et en début de journée.

2. Microscopie électronique à transmission

Afin d'éviter les risques d'artefacts, les feuilles sont plongées dans le fixateur (tampon phosphate 0,1 M, 2,5 % paraformaldéhyde, 2 % glutaraldéhyde, pH 7,2) et des fragments de 1 mm² sont prélevés dans la zone pétiolaire du limbe. Ces fragments sont ensuite placés dans des flacons contenant du fixateur et subissent un vide ménagé (400 mm Hg) durant 15 à 20 min. Puis le fixateur est changé et la durée de la fixation n'excède pas 4 h à la température ambiante. Après plusieurs rinçages dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,2, les échantillons sont post-fixés dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % durant 4 h, puis déshydratés par l'éthanol et inclus dans une résine époxy (épon).

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Reichert Om U3 et recueillies sur des grilles de cuivre (200 mesh) recouvertes d'un film de Parlodium carbone.

Le contraste des coupes est augmenté par une double coloration acétate d'uranyle, citrate de plomb (REYNOLDS 1963).

Les observations sont réalisées avec un microscope électronique Philips EM 301 travaillant sous une tension de 80 kV.

Résultats

1. Ultrastructure du limbe foliaire sain (Fig. 1 a et b)

Les cellules du parenchyme foliaire de vigne, serrées les unes contre les autres, présentent une structure conventionnelle; les organites, enrobés par une matrice cyto-

Fig. 1 a and b: Ultrastructural aspects of palisadic cells from healthy leaves: nucleus (N), mitochondria (M), chloroplasts (Chl) with starch grains (A), small vacuoles (V) and tannin vesicles (Vt) ($\times 15,000$).

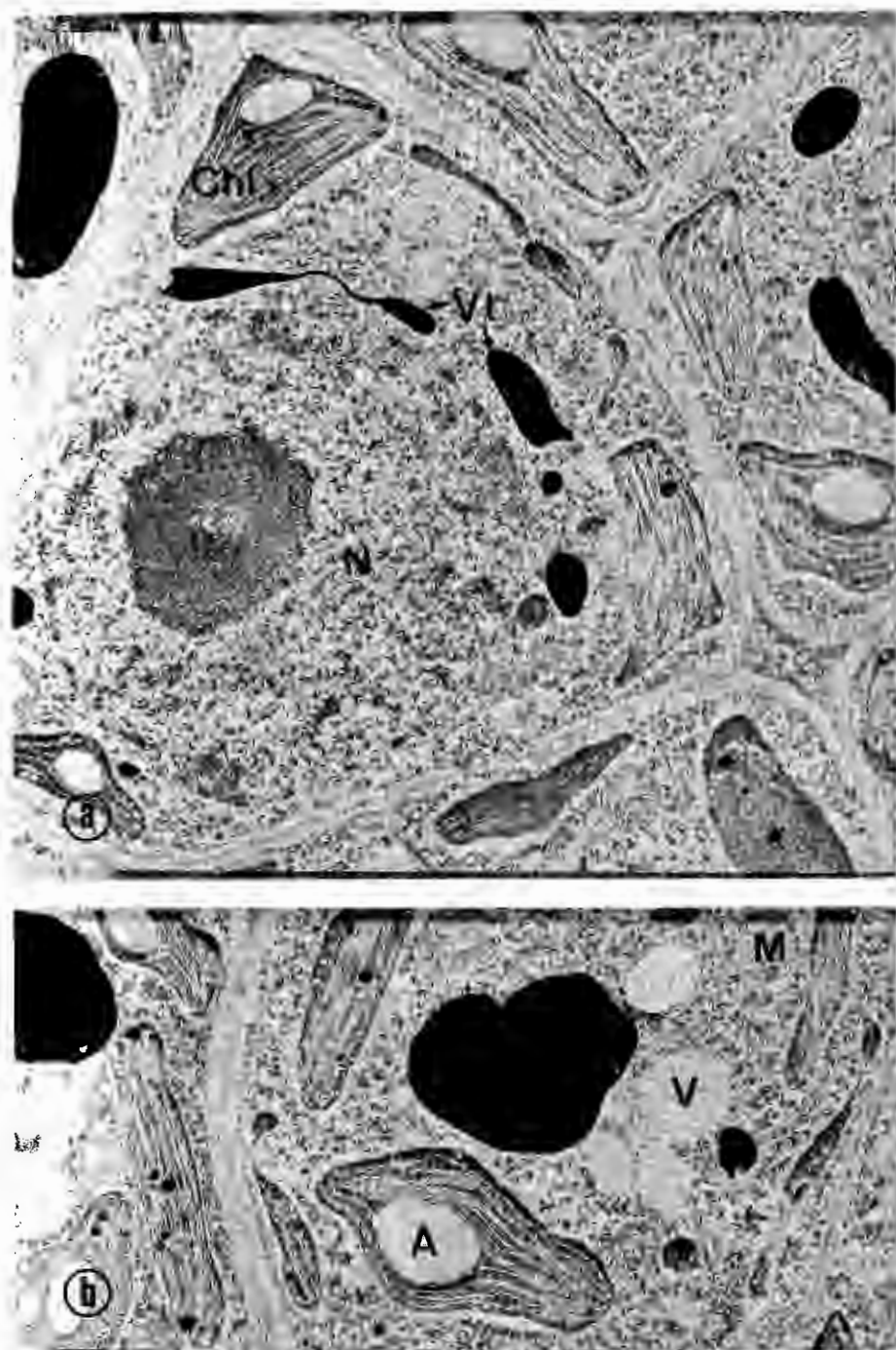


Fig. 1 a et b: Ultrastructure des cellules du parenchyme palissadique de feuille saine. On peut observer les différents organites: noyau (N), mitochondries (M), chloroplastes (Chl) à amidon (A), petites vacuoles (V) et vésicules tanniques (Vt) ($\times 15.000$).

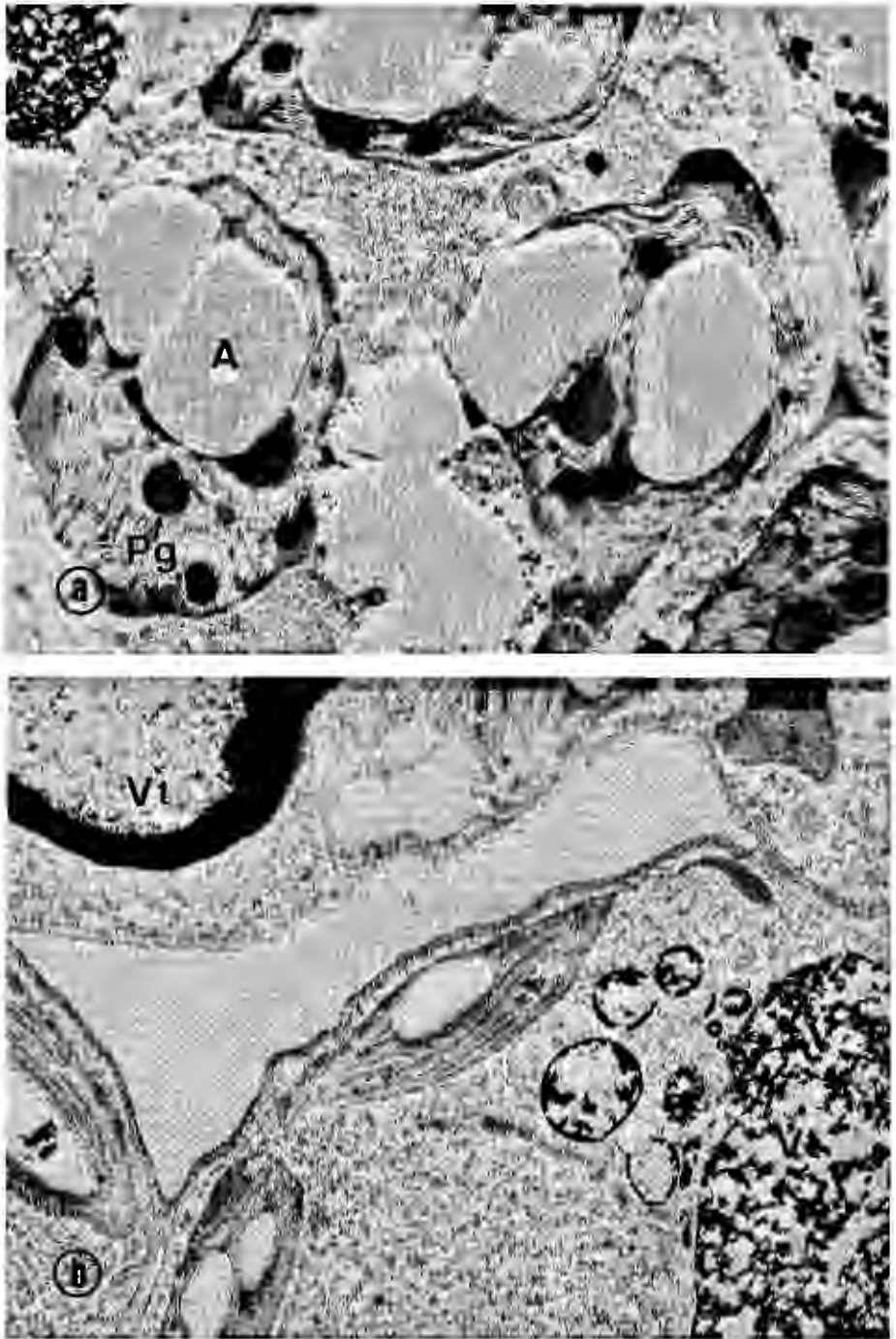


Fig. 2: Modifications ultrastructurales du parenchyme palissadique de feuilles prélevées sur des ceps présentant de faibles symptômes d'eutypiose. — a) Chloroplastes hypertrophiés contenant des

plasmique homogène, se révèlent intacts. Le noyau, volumineux, occupe approximativement le centre de la cellule. Les chloroplastes d'environ 2 à 3 μm de long sur 1 à 1,5 μm de large, et à thylakoïdes bien développés, occupent une position périphérique. Leur stroma est parsemé de quelques grains osmiophiles (1 à 6 plastoglobules) et de grains d'amidon d'environ 1 μm de long sur 0,5 à 0,9 μm de large. Les vacuoles, petites et de forme arrondie, contiennent des tanins apparaissant sous forme de plages denses aux électrons.

2. Modifications ultrastructurales du limbe foliaire prélevé sur des ceps malades de Cabernet Sauvignon

Sur des échantillons peu atteints, les organites les plus touchés semblent être les chloroplastes. Dans certaines cellules (Fig. 2 a), ils apparaissent hypertrophiés (4 à 5 μm de long sur 3 à 3,5 μm de large) et occupent une partie importante du volume cellulaire; ils contiennent de gros grains d'amidon (environ 2 à 2,5 μm de long sur 1 à 1,5 μm de large) et des plastoglobules dont le nombre (4 à 11) et la taille ont également augmenté.

Toutefois, des cellules voisines (Fig. 2 b) paraissent moins altérées, la répartition des chloroplastes et leurs dimensions étant voisines de celles des chloroplastes de cellules saines de Cabernet Sauvignon.

Ces images traduisent donc l'hétérogénéité des réponses des cellules foliaires.

D'autre part, la proportion des tanins semble réduite par rapport au témoin; ceux-ci restent localisés à la périphérie de la vacuole ou constituent une matrice granuleuse occupant tout le volume vacuolaire (Fig. 2 b).

Sur des échantillons montrant des symptômes avancés d'eutypiose, l'altération cellulaire est intense (Fig. 3). Elle se manifeste en effet par:

- un décollement important du plasmalemme,
- une dégradation des chloroplastes dont les thylakoïdes se vacuolisent, laissant apparaître des plages claires,
- une altération des autres systèmes endomembranaires qui apparaissent sous une forme plus ou moins vacuolisée, ainsi qu'une lyse du cytoplasme.

Au cours de l'examen de nombreuses coupes, aucune hyphe de champignon n'a été observée.

Discussion

La description des cellules de limbe porté par des ceps de Cabernet Sauvignon atteints d'eutypiose, fait apparaître de profondes altérations des divers constituants cellulaires.

Le plasmalemme représente sans doute le premier site cellulaire en contact avec les composés toxiques libérés par l'agent pathogène. Aussi, les observations cytologiques de cette membrane doivent-elles être complétées à un grossissement supérieur. Cependant, la rupture du plasmalemme a pu être observée dans les cellules de

gros grains d'amidon (A) et des plastoglobules (Pg) ($\times 15.000$). — b) Cellules voisines moins altérées. Les tanins (Vt) sont répartis à la périphérie de la vacuole ou constituent une matrice granulaire ($\times 13.500$).

Ultrastructural modifications of palisadic cells from leaves of slightly diseased plants. — a) Enlarged chloroplast with big starch grains (A) and plastoglobuli (Pg) ($\times 15,000$). — b) Neighbouring cells less affected. The tannins (Vt) either line the margin of the vacuole or constitute a granular matrix ($\times 13,500$).

Cabernet Sauvignon profondément atteintes par la maladie. Il est vraisemblable que des perturbations fonctionnelles surviennent très précocement avant toute altération structurale. Il a été possible, en effet, de montrer qu'une heure de confrontation de disques de feuilles avec l'eutypine a suffi à provoquer l'efflux d'ions K^+ et Na^+ (TEY-RULH 1988). Le plasmalemme, ainsi que le tonoplaste d'ailleurs, pourraient être incapables d'assurer leur fonction de perméation sélective. Cette hypothèse expliquerait aussi l'apparition de nécroses foliaires par la formation de produits bruns dus à la mise en contact de composés phénoliques contenus dans les vacuoles avec des enzymes de brunissement présentes dans le cytoplasme.

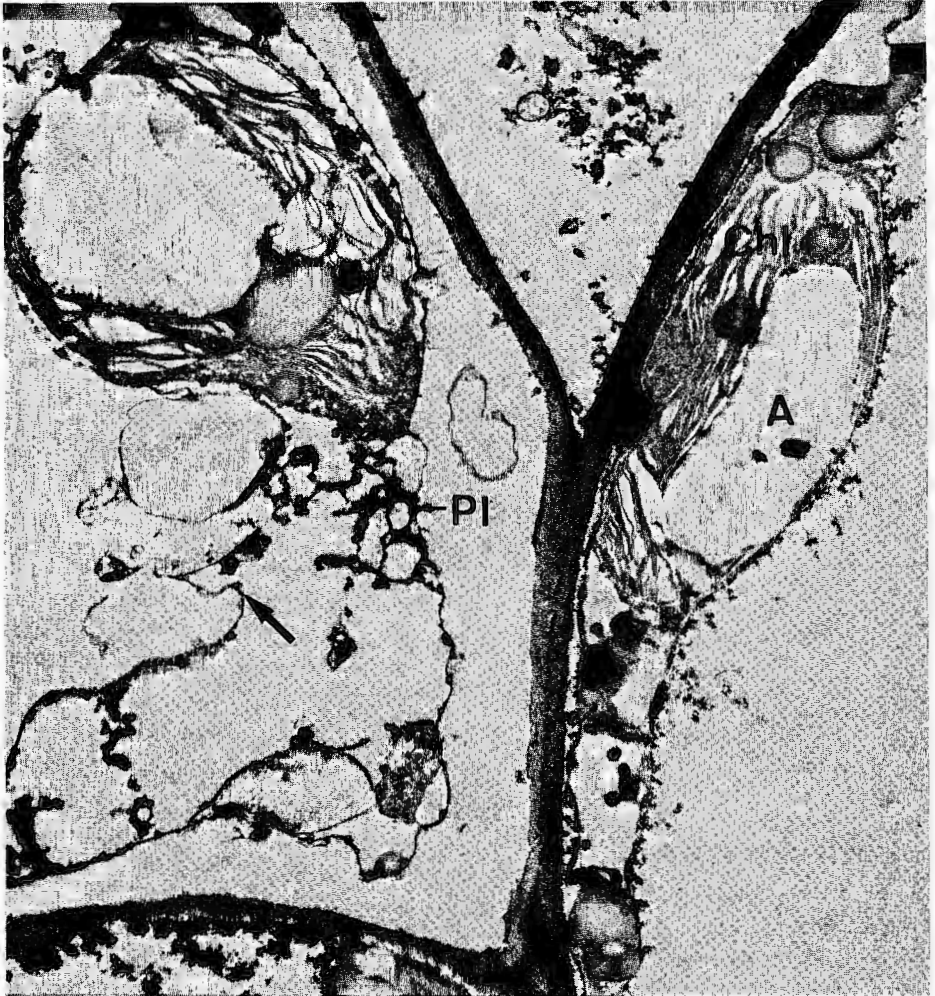


Fig. 3: Modifications ultrastructurales du parenchyme palissadique de feuilles prélevées sur des ceps présentant des symptômes très accusés d'eutypiose. Plasmalemme (PI) décollé, altération profonde des chloroplastes (Chl) et du cytoplasme qui apparaît sous la forme de résidus membranaires (flèche) ($\times 15,000$).

Ultrastructural alterations of palisadic cells from leaves of severely diseased plants. Retracted plasmalemma (PI), severe damage of chloroplasts (Chl) and cytoplasm in the form of membrane residues (arrow) ($\times 15,000$).

Les chloroplastes présentent de profondes modifications structurales: désorganisation des systèmes membranaires, avec vésiculation, écartement des thylakoïdes et dépôt de volumineux grains d'amidon. De tels remaniements sont observés dans les hôtes d'autres parasites. L'interaction *Zea mays* — *Helminthosporium maydis* race T, par exemple, se traduit par l'effondrement du système lamellaire et l'éclaircissement des chloroplastes (WHITE *et al.* 1973). La tabtoxine produite par *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* détermine sur les feuilles de tabac une chlorose se traduisant par une dilatation des thylakoïdes et l'apparition de nombreuses vésicules dans le stroma (DURBIN 1971). Il en est de même dans le cas de la tentoxine synthétisée par *Alternaria tennis* et appliquée à des cotylédons d'*Ipomoea hederacea* var. *hederacea* (DUKE *et al.* 1980), de la cercosporine, toxine de *Cercospora beticola* agissant sur des feuilles de *Beta vulgaris* (STEINKAMP *et al.* 1981) et de la toxine synthétisée par *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* et fournie à des plantules de tomate (KRÄMER et LEISTNER 1986). Plus généralement, d'autres stress peuvent entraîner des réponses similaires: il en est ainsi d'une privation d'azote chez le soja (GRIMA-PETTENATI 1985) et d'une carence en azote ou en phosphate chez le blé (VERHOEVEN et ENGELBRECHT 1979).

Le stockage d'amidon dans les chloroplastes est un phénomène de pathogenèse souvent observé (MIROCHA et ZAKI 1966; MACDONALD et STROBEL 1970; LALLYET 1977). La présence de grains géants dans les cellules de feuilles de Cabernet Sauvignon présentant des symptômes peu prononcés d'eutypiose est très caractéristique. Ce fait paraît en désaccord avec un résultat relatif à l'effet de l'eutypine sur l'assimilation de $^{14}\text{CO}_2$ dans des feuilles entières excisées de Cabernet Sauvignon; la toxine inhibe en effet ce phénomène (SOULIER 1990, résultats non publiés). Il faut noter cependant que la fixation photosynthétique de $^{14}\text{CO}_2$ de feuilles détachées est faible par rapport à celle obtenue au champ, à cause d'une fermeture partielle des stomates (CALMES et VIGNES 1976). D'autres méthodes de mesure seront mises en œuvre pour savoir si la photosynthèse est effectivement affectée par l'eutypiose. Parmi les hypothèses formulées pour expliquer l'accumulation d'amidon, on peut citer la réduction de la dégradation nocturne de ce polymère ou la baisse de la demande en assimilats de la part des organes receveurs, se traduisant par une exportation ralentie de saccharose à partir des cellules du mésophylle. Il ne semble pas que l'hypothèse de l'inactivation des enzymes requises pour la dégradation de l'amidon puisse être retenue car la disparition totale de ce polysaccharide dans les cellules de feuilles de Cabernet Sauvignon très malade suppose le bon fonctionnement des enzymes du catabolisme de l'amidon. La teneur en chlorophylles n'a pas été mesurée dans les feuilles malades; mais elle ne deviendrait un facteur limitant de la photosynthèse que lorsqu'elle atteint des valeurs très basses (KECK *et al.* 1970) et, lors de la sénescence, la baisse de l'aptitude à la photosynthèse est généralement plus précoce que la perte de chlorophylles (THIMANN 1980).

Les profondes altérations ultrastructurales du système photosynthétique s'accompagnent certainement de perturbations de son fonctionnement. Il est vraisemblable que même si le chloroplaste n'est pas la cible primaire d'*E. lata*, la faible photosynthèse des feuilles atteintes explique, au moins partiellement, la mort des ceps malades.

De tels remaniements ultrastructuraux, qui n'avaient jamais fait l'objet d'étude, montrent le rôle néfaste joué par *E. lata* sur l'appareil végétatif et expliquent le jaunissement des feuilles. Ils sont provoqués à distance par le champignon et donc dus aux substances qu'il synthétise. Notre démarche consiste à essayer de les reproduire à l'aide de l'eutypine, appliquée par exemple à des systèmes expérimentaux simplifiés.

De toute façon, il est clair qu'un cep dont les feuilles sont si gravement altérées est dans l'impossibilité d'assurer sa nutrition carbonée. La production de raisin s'en trouve réduite et le dépérissement de la souche apparaît inéluctable.

Résumé

Le champignon *Eutypa lata*, qui se développe dans les tiges âgées des ceps de vigne, détermine à distance des symptômes caractéristiques sur les feuilles de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon, variété très sensible.

Pour la première fois, les altérations de cellules du limbe, produites *in vivo* par la maladie, sont décrites à l'aide d'observations en microscopie électronique à transmission. Les principaux remaniements ultrastructuraux de la feuille, prélevée en juin, varient selon le degré d'intensité de la maladie.

Dans les feuilles de ceps peu atteints, les chloroplastes hypertrophiés présentent une dilatation des thylakoïdes faisant apparaître des plages peu denses aux électrons, et parfois une accumulation importante d'amidon. Dans les feuilles de plantes très atteintes, les cellules sont complètement désorganisées, avec décollement du plasmalemme, dégradation des chloroplastes, lyse du cytoplasme et des autres systèmes endomembranaires.

Ces résultats suggèrent que la déstructuration de l'appareil photosynthétique peut être la cause, au moins partielle, de la mort des ceps de Cabernet Sauvignon.

Cette étude fait partie d'un programme CEE «Lutte contre l'eutypiose» no. 8001-CT-91.205. Section DG VI F II/3.

Références bibliographiques

- BARRAULT, G.; AL-ALI, B.; PETITPREZ, M.; ALBERTINI, L.; 1982: Contribution à l'étude de l'activité toxique de l'*Helminthosporium teres*, parasite de l'orge (*Hordeum vulgare*). Can. J. Bot. **60**, 330—339.
- BERNARD, A. C.; MUR, G.; 1986: Les sites de présence sur la souche du mycélium d'*Eutypa lata*, agent causal de l'eutypiose de la vigne. Progr. Agric. Vitic. **103**, 288—289.
- CALMES, J.; VIGNES, D.; 1976: Modifications des échanges gazeux et du métabolisme glucidique de la feuille isolée par rapport à la feuille sur pied. Photosynthetica **10**, 255—263.
- CARTER, M. V.; PRICE, T. V.; 1973: *Eutypa armeniaca* associated with vascular disease in grapevine and barberry. Austral. Plant. Pathol. Soc. Newslett. **2** (4), 27.
- DUBOS, B.; LE GALL, D.; MUR, G.; 1989: Les maladies du bois: *Esca* et *Eutypa*. Incidences économiques, symptômes et moyens de lutte. Progr. Agric. Vitic. **106**, 143—147.
- DUKE, S. O.; PAUL, R. N.; WICKLIFF, J. L.; 1980: Teñtoxin effects on ultrastructure and greening of ivy-leaf morningglory (*Ipomoea hederacea* var. *hederacea*) cotyledons. Physiol. Plant. **49**, 27—36.
- DURBIN, R. D.; 1971: Chlorosis-inducing pseudomonad toxins: their mechanism of action and structure. In: AKAI, S., OUCHI, S., (Eds.): Morphological and Biological Events in Plant-Parasite Interaction, 369—382. Phytopathology Society, Japan, Tokyo.
- FALLOT, J.; TEY-RULH, P.; COUTOULY, P.; PETITPREZ, M.; ROUSTAN, J. P.; PHILIPPE, I.; TABACCHI, R.; 1990: Cultures *in vitro*, étude de l'eutypiose et stratégie de création de somaclones de vignes tolérantes. Cinquantenaire de la culture *in vitro*, Versailles, 24—25 octobre 1989, n° 51, 151—159. Ed. INRA, Paris.
- GRIMA-PETTENATI, J.; 1985: Effets d'une privation d'azote sur la nutrition carbonée et la dégradation des protéines foliaires chez le soja. Thèse Univ. Paul Sabatier, Toulouse, France.
- KECK, R. W.; DILLEY, R. A.; KE, B.; 1970: Photochemical characteristics in a soybean mutant. Plant Physiol. **46**, 699—704.
- KRÄMER, R.; LEISTNER, H. U.; 1986: Physiologische und cytologische Aspekte der Wirkung des Toxins von *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (SMITH) JENSEN auf die Wirtspflanze. Zentralbl. Mikrobiol. **141**, 437—451.
- LALLYET, C. I. K.; 1977: Ultrastructural changes in trifoliolate leaves of bean following inoculation of monofoliolate leaves with *Pseudomonas phaseolicola*. Physiol. Plant Pathol. **10**, 229—236.
- MACDONALD, P. W.; STROBEL, G. A.; 1970: Adenosine diphosphate-glucose pyrophosphorylase control of starch accumulation in rust-infected wheat leaves. Plant Physiol. **46**, 126—135.

- MIROCHA, C. J.; ZAKI, A. I.; 1966: Fluctuations in amount of starch in host plants invaded by rust and mildew fungi. *Phytopathology* **56**, 1120—1124.
- PHILIPPE, I.; 1991: L'eutypiose de la vigne (*Eutypa lata*). Détection de l'eutypine dans les plantes malades et altérations cytologiques de la feuille. Thèse Doctorat INP Toulouse III, France.
- RENAUD, J. M.; 1985: Isolement et identification de métabolites secondaires et phytotoxiques d'*Eutypa armeniaca*. Thèse Univ. Neuchâtel, Suisse.
- REYNOLDS, B. S.; 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**, 208—212.
- STEINKAMP, M. P.; MARTIN, S. S.; HOEFERT, L. L.; RUPPEL, E. G.; 1981: Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by cercosporin, a toxin from *Cercosporina beticola*. *Phytopathology* **71**, 1272—1281.
- TEY-RULH, P.; 1988: Métabolites toxiques sécrétés *in vitro* par *Eutypa lata* (PERS.: FR.) TUL., parasite de la vigne. Isolement et activité biologique. Thèse Doctorat INP Toulouse III, France.
- — ; PHILIPPE, I.; REAUD, J. M.; TSOUFRAS, G.; DE ANGELIS, P.; FALLOT, J.; TABACCHI, R.; 1991: Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata*, the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry* **30**, 471—473.
- THIMANN, K. V.; 1980: The senescence of leaves. In: THIMANN, K. V. (Ed.): *Senescence in Plants*, 117—180. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- VERHOEVEN, R. C.; ENGELBRECHT, A. H. P.; 1979: Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and sulfur deficiencies on the chloroplasts of *Triticum aestivum*. *S. Afr. J. Sci.* **75**, 307—310.
- WHITE, J. A.; CALVERT, O. H.; BROWN, M. F.; 1973: Ultrastructural changes in corn leaves after inoculation with *Helminthosporium maydis* race T. *Phytopathology* **63**, 296—300.

Reçu le 15 juillet 1991

Correspondance à:

J. FALLOT
Professeur
Ecole Nationale Supérieure
Agronomique
145 avenue de Muret
F-31076 Toulouse Cédex
France