

Evolution de la composition en polyamines des baies de raisin au cours du processus d'infection par *Botrytis cinerea*

A. DARRIEUMERLOU¹, L. GENY¹, M. BROQUEDIS² et B. DONÈCHE¹

¹ Faculté d'Oenologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Talence, France

² Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université Bordeaux 1, Talence, France

Résumé

Les polyamines sont des régulateurs de croissance naturellement présents chez la vigne (*Vitis vinifera* L.) et les champignons pathogènes tels que *Botrytis cinerea*. L'étude comparée de la composition en polyamines du mycélium de *Botrytis cinerea* cultivé *in vitro* et de celle de baies de raisin parasitées, a permis de mettre en évidence des modifications importantes dans le métabolisme des polyamines de ces baies. Ces modifications sont étroitement liées à la présence et au développement du champignon dans ces organes. Elles sont caractérisées par des teneurs anormales en polyamines qui semblent être d'origine fongique pour les polyamines libres et d'origine végétale pour les polyamines conjuguées. Le rôle possible de chaque catégorie de polyamines est discuté dans la relation hôte-parasite.

Evolution of polyamine composition in grape berries during infection with *Botrytis cinerea*

Polyamines are growth regulators occurring naturally in grapevine (*Vitis vinifera* L.) and pathogenic fungi, e.g. *Botrytis cinerea*. Investigation of polyamines of *in vitro*-grown *Botrytis cinerea* mycelium and infected berries has shown modifications in the metabolism of the berries which are directly related to the development of the fungi in the berries. The abnormal polyamine concentrations in infected berries appear to be of fungal origin for free polyamines and of plant origin for conjugated polyamines. The specific role of each type of polyamine is discussed with regard to the host-parasite relation.

Key words: *Botrytis cinerea*, *Vitis vinifera* L., free and conjugated polyamines, *in vitro* culture, host-parasite interaction.

Introduction

Les polyamines sont présentes chez de nombreux organismes tels que les végétaux supérieurs et les champignons phytopathogènes (MARTIN-TANGUY 1985). Ces régulateurs de croissance sont nécessaires à leur développement. Ils

permettent aussi aux plantes de réagir à différents types de stress, d'origine abiotique (FLORES *et al.* 1985) ou biotique comme celui provoqué par *Botrytis cinerea* (MARTIN-TANGUY 1985).

La présence de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise, dans la baie de raisin peut provoquer de profondes modifications biochimiques qui ont, le plus souvent, un effet défavorable sur son évolution, ses caractéristiques organoleptiques et œnologiques (DONÈCHE 1987). Les polyamines des baies botrytisées sont particulièrement concernées par ces modifications. Les premiers résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une accumulation de ces composés. Il a été suggéré que cette accumulation pourrait jouer un rôle protecteur dans l'adaptation de la plante à ce type de stress (MARTIN-TANGUY 1985).

Afin d'essayer de déterminer l'origine de ces polyamines dans les baies parasitées, d'étudier leur rôle dans la relation hôte-parasite et dans la résistance à l'infection, des cultures de *Botrytis cinerea* ont été réalisées sur du moût de raisin. L'étude comparée des polyamines lors du développement du champignon *in vitro* et dans la baie infectée nous a permis d'apporter des informations nouvelles sur les mécanismes impliqués dans cette relation.

Matériel et Méthodes

Les analyses de polyamines ont été effectuées d'une part, à partir de baies botrytisées, prélevées à la maturité sur des vignes de cépage blanc Sémillon situées à Sauternes (près de Bordeaux, France) et d'autre part, à partir de mycélium de *Botrytis cinerea* provenant de la souche C77:4 cultivée *in vitro* (collection de la faculté d'œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France).

Prélèvements des baies en champ: Les baies botrytisées ont été prélevées le même jour et séparées en lots homogènes selon les 6 stades différents définis par DONÈCHE (1987) et qui caractérisent le développement de la pourriture à partir de baies saines (stade 1). Des conidies de *Botrytis cinerea* émettent un ou plusieurs tubes germinatifs qui cheminent à la surface de la cuticule de la baie de raisin et qui pénètrent par les diverses microfissures de la pellicule. C'est la cause la plus probable d'infection qui se traduit au début par des lésions de diamètre inférieur à 5 mm

(stade 2 ou baie tachetée). Le développement du mycélium au niveau de la lamelle moyenne des parois pectocellulosiques des premières assises cellulaires sous-épidermiques conduit à l'extension de la lésion (stade 3: baie tachée avec des lésions de diamètre supérieur à 5 mm) qui envahit finalement la totalité de la périphérie de la baie (stade 4: baie pourrie pleine ou entièrement tachée). L'observation microscopique ne révèle qu'exceptionnellement une attaque s'étendant jusqu'aux cellules de la pulpe. Au début du stade 5, le mycélium développé au sein des parois cellulaires, émet des filaments qui surgissent à l'extérieur de la pellicule. Le champignon poursuit son développement mais les parois cellulaires altérées ne peuvent plus retenir l'eau de constitution des cellules et la baie de raisin se déshydrate pour atteindre le stade «pourri rôti» (stade 6) (PUCHEU-PLANTÉ et MERCIER 1983).

Pour chaque stade, 10 baies ont été plongées directement dans une solution d'acide chlorhydrique (1 M) et conservées au froid jusqu'à l'analyse des polyamines. Parallèlement à l'analyse des polyamines, le rapport sucres/acidité totale, le contenu en eau et le poids frais d'une baie de raisin ont été déterminés pour chaque stade.

Culture *in vitro* de *Botrytis cinerea* : Le champignon a été cultivé dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 50 ml de moût blanc. Une suspension de conidies (10^6 ml^{-1}) de *Botrytis cinerea* (souche C77:4) a été utilisée comme inoculum à raison de 10 % du volume de milieu. Les cultures ont été réalisées sans agitation dans une enceinte à 20 °C et une photopériode de 12 h. Tous les trois jours et pendant 16 jours, des cultures ont été arrêtées pour réaliser les analyses. Le mycélium a été séparé du moût par filtration, placé dans une solution d'acide chlorhydrique (1 M) et conservé au froid jusqu'à l'analyse des polyamines. Les stades de prélèvements sont les suivants:

Prélèvement	Stade de développement du mycélium (en jours de culture)
T1	3,5
T2	7
T3	10
T4	13
T5	16,5

Analyse des polyamines libres et conjuguées : Pour les baies et les mycéliums, les analyses ont porté sur la putrescine (Put), la spermidine (Spd), la spermine (Spm) et le diaminopropane (Dap). Ces polyamines, libres et conjuguées, ont été extraites et dérivées par dansylation selon la méthode de FLORES et GALSTON (1982). Elles ont ensuite été identifiées et quantifiées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplée à un détecteur fluorimétrique selon la méthode de SMITH et DAVIES (1985) adaptée à notre matériel végétal (GENY *et al.* 1997).

Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de 3 répétitions par échantillon et sont exprimés en nmol de polyamines par g de biomasse mycélienne fraîche ou par baie. L'expression en nmol de polyamines par baie permet de prendre en considération l'évolution des polyamines endogènes du raisin et l'apparition des polyamines fongiques sans

que ces phénomènes ne soient masqués par la déshydratation régulière des baies parasitées au cours du processus d'infection.

Résultats

Evolution des teneurs en polyamines endocellulaires du mycélium de *Botrytis cinerea* développé *in vitro* : Lors de la croissance du champignon, la teneur en polyamines totales varie en fonction du stade de développement (Fig. 1). Elle augmente au début de la croissance jusqu'au stade T2 puis diminue régulièrement. Quel que soit le stade de développement, la répartition des différentes polyamines est toujours la même: les polyamines libres sont les plus importantes suivies des polyamines liées aux macromolécules et des polyamines liées aux molécules de faible poids moléculaire.

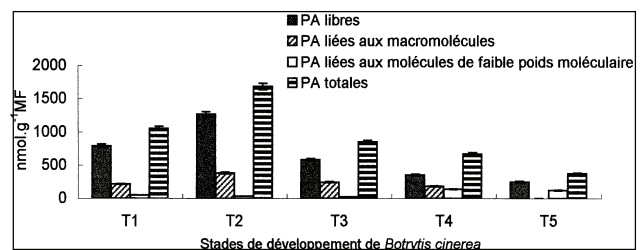


Fig. 1: Evolution des polyamines (PA) endocellulaires au cours du développement de *Botrytis cinerea in vitro*. Les résultats correspondent à la moyenne (\pm SD) de trois répétitions par échantillon.

Evolution of polyamines (PA) in the mycelium of *Botrytis cinerea* during its *in vitro* development. Results are means (\pm SD) of three replicates.

Dans le mycélium, la putrescine et la spermidine sont présentes sous formes libre et conjuguées alors que le diaminopropane n'existe que sous forme liée aux macromolécules (Fig. 2).

Au cours du développement du mycélium, la teneur en putrescine libre augmente jusqu'au stade T2 puis diminue alors que la teneur en spermidine libre décroît régulièrement. Pour les polyamines liées aux macromolécules, les mêmes tendances sont observées pour la putrescine et la spermidine accompagnées d'une accumulation de diaminopropane au stade T2. On note de faibles teneurs en polyamines liées aux molécules de faible poids moléculaire, seule la spermidine liée s'accumule aux stades T4 et T5.

Evolution de quelques caractéristiques des baies parasitées par *Botrytis cinerea* au cours du processus d'infection : Le processus d'infection de la baie de raisin par *Botrytis cinerea* entraîne une augmentation du rapport sucres/acidité totale et une diminution du poids frais des baies de raisin résultant de la diminution du contenu en eau (Tableau). Dans ce cas typique de "pourriture noble", il peut être assimilé à une véritable surmaturation.

Evolution des teneurs en polyamines des baies parasitées par *Botrytis cinerea* au cours du processus d'infection : A maturité,

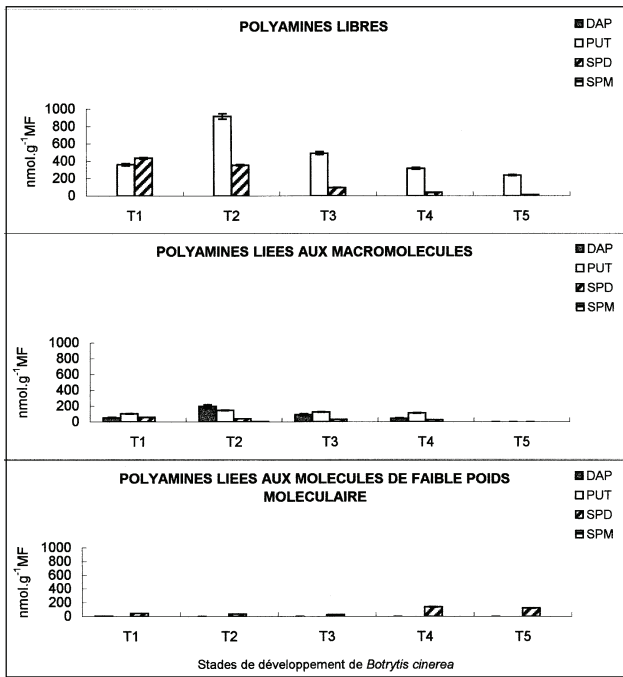


Fig. 2: Répartition des polyamines (libres et liées) dans le mycélium de *Botrytis cinerea* à différents stades de son développement *in vitro*. Les résultats correspondent à la moyenne (\pm SD) de trois répétitions par échantillon. DAP, PUT, SPD, SPM: voir Matériel et Méthodes.

Distribution of free and conjugated polyamines in *Botrytis cinerea* mycelium at different stages of its *in vitro* development. Results are means (\pm SD) of three replicates. DAP, PUT, SPD, SPM: see Material and Methods.

Tableau

Evolution des principales caractéristiques chimiques et physiques des baies de raisin au cours du processus d'infection par *Botrytis cinerea*

Evolution of the main chemical and physical characteristics of berries during infection by *Botrytis cinerea*

Stades d'infection	Rapport sucres/acidité totale (g.mEq ⁻¹)	Contenu en eau (% du poids frais)	Poids frais d'une baie de raisin (g)
Stade 1	3,86	75,0	3,29
Stade 2	4,96	65,5	2,68
Stade 3	4,72	63,8	2,57
Stade 4	4,85	59,8	2,50
Stade 5	6,27	58,3	2,53
Stade 6	17,70	39,4	1,30

les baies saines (stade 1) sont caractérisées par de faibles teneurs en polyamines (Fig. 3). Les principales sont la putrescine libre ainsi que la spermidine et la spermine liées aux molécules de faible poids moléculaire (Fig. 4).

Lors de l'infection par *Botrytis cinerea*, les teneurs et la répartition des différentes catégories des polyamines dans les baies sont profondément modifiées (stades 2 à 6 des Figs 3 et 4). Les teneurs en polyamines totales sont forte-

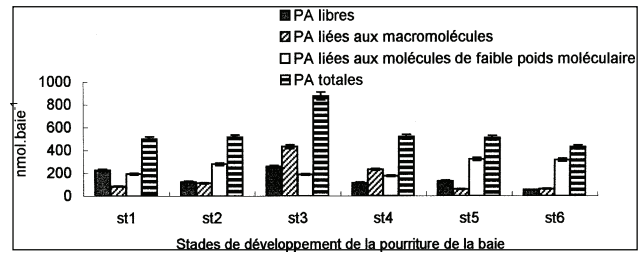


Fig. 3: Evolution des polyamines dans le raisin au cours du processus d'infection par *Botrytis cinerea*. Les résultats correspondent à la moyenne (\pm SD) de trois répétitions par échantillon.

Evolution of polyamines in grape berries during infection by *Botrytis cinerea*. Results are means (\pm SD) of three replicates.

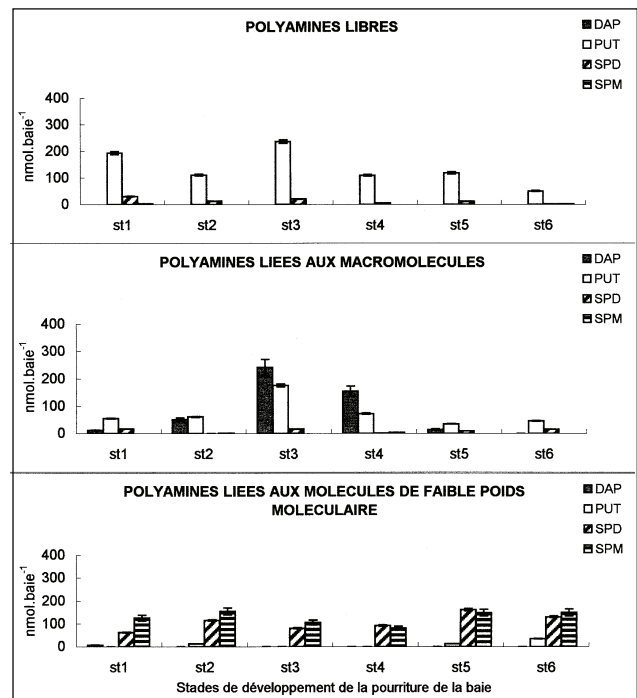


Fig. 4: Répartition des polyamines (PA) (libres et liées) dans le raisin au cours du processus d'infection par *Botrytis cinerea*. Les résultats correspondent à la moyenne (\pm SD) de trois répétitions par échantillon. DAP, PUT, SPD, SPM: voir Matériel et Méthodes.

Distribution of free and conjugated polyamines (PA) in grape berries during infection by *Botrytis cinerea*. Results are means (\pm SD) of three replicates. DAP, PUT, SPD, SPM: see Material and Methods.

ment augmentées au stade 3 en raison d'une accumulation massive de polyamines liées aux macromolécules. Dans les baies infectées, les polyamines libres ne sont jamais majoritaires, contrairement à ce qui est observé dans les baies saines. Aux stades 3 et 4, les polyamines liées aux macromolécules sont les polyamines les plus importantes alors qu'aux stades 2, 5 et 6 ce sont les polyamines liées aux molécules de faible poids moléculaire.

Comme dans les baies saines, à tous les stades de l'infection, la polyamine libre prédominante est la putrescine suivie de la spermidine (Fig. 4). Pour les polyamines liées aux macromolécules, le diamino propane s'accumule dans les baies infectées aux stades 2, 3 et 4 alors qu'aux autres stades, les polyamines les plus importantes sont la put-

rescine et la spermidine comme dans les baies saines. En ce qui concerne les polyamines liées aux molécules de faible poids moléculaire, *Botrytis cinerea* affecte peu les teneurs en polyamines des baies de raisin.

Discussion et Conclusion

Ces résultats ont permis, pour la première fois, de mettre en évidence d'une part, les différentes polyamines libres et conjuguées contenues dans le mycélium de *Botrytis cinerea* cultivé *in vitro* et d'autre part, les modifications du métabolisme des polyamines libres et conjuguées dans des baies de raisin infectées par ce parasite.

Ce champignon est caractérisé par d'importantes teneurs en polyamines, comme *Eutypa lata*, autre champignon parasite responsable de l'eutypiose de la vigne (BROQUEDIS *et al.* 1993). Les polyamines libres (putrescine et spermidine) sont les plus abondantes. On note également la présence relativement importante de diamino propane lié aux macromolécules. Ce contenu en polyamines évolue au cours du développement de *Botrytis* sur milieu liquide, puisque sa vitesse de croissance (donnée non publiée) et ses teneurs en polyamines deviennent maximales au même moment, c'est-à-dire 7 jours après l'inoculation (stade T2). Ces résultats confirment que le champignon synthétise d'importantes quantités de polyamines qui sont nécessaires à son développement (GALSTON et KAUR-SAWHNEY 1995) et mettent ici clairement en évidence la relation de ces composés avec la croissance, comme l'ont déjà rapporté de nombreux auteurs (HEBY 1981; TABOR et TABOR 1985; PEGG 1988; EVANS et MALMBERG 1989; WALTERS 1995).

Dans les baies botrytisées, les teneurs et la répartition des différentes polyamines sont profondément modifiées. La comparaison des différents stades d'infection montre qu'au début de l'attaque (stade 3), il se produit une accumulation importante de polyamines libres, notamment de putrescine, et de polyamines liées aux macromolécules (diamino propane et putrescine). Cette accumulation correspond probablement à la phase de croissance intense du champignon au niveau des parois des cellules des premières assises situées sous la pellicule de la baie de raisin (PUCHEU-PLANTÉ et MERCIER 1983).

Dans la relation hôte-parasite, il semble donc qu'une partie des polyamines présentes dans les baies infectées pourraient provenir directement du champignon. En effet, la courbe d'évolution des teneurs en polyamines est comparable pour le mycélium et pour les baies parasitées. Ainsi, le stade 3 de l'infection du raisin et le stade T2 du développement *in vitro* de *Botrytis cinerea* correspondent aux teneurs maximales en polyamines des baies parasitées et du mycélium respectivement. Cette forte augmentation des teneurs semble être due au cumul des polyamines provenant à la fois du champignon et des cellules du raisin. A ce stade de surmaturation, les relations de la grappe avec le reste de la plante sont trop limitées pour envisager une importation depuis les feuilles.

Des études antérieures ont mis en évidence que les polyamines libres peuvent s'accumuler de façon importante

dans les cellules végétales pendant les phases de forte croissance (GALSTON 1983; SMITH 1985; SLOCUM et FLORES 1991) et les polyamines conjuguées lors d'un stress biologique (CLARKE 1982; FLORES *et al.* 1985; GENY *et al.* 1997). Le rôle des polyamines conjuguées dans les situations de stress reste encore à préciser. D'après ALTMAN *et al.* (1982), la liaison des polyamines à des groupements acides peut à la fois stabiliser les membranes et réguler la biosynthèse et l'activation des acides nucléiques et des protéines qui sont perturbées lors d'un stress. D'autre part, FLORES et FILNER (1985) suggèrent que la conjugaison des polyamines peut être un moyen de réguler les quantités de polyamines libres dans les cellules végétales. Ce mécanisme limite le pool de polyamines libres que le champignon pathogène pourrait directement utiliser pour sa croissance. Ces résultats nous conduisent à émettre l'hypothèse qu'une grande partie des polyamines libres, détectées dans les baies infectées, est synthétisée principalement par le champignon alors que les fortes teneurs en polyamines liées aux macromolécules correspondent plus vraisemblablement à une réaction de défense de la plante.

Dans les baies de raisin botrytisées, le métabolisme des polyamines apparaît donc profondément perturbé par la présence du parasite. Ces premiers résultats ont permis de mettre en évidence le rôle fondamental des polyamines en tant que molécules liées à l'activité de croissance chez le champignon et en tant que molécules de réponse au stress chez la plante. Dans le cas des polyamines conjuguées, le mode d'action de ces molécules n'est pas encore totalement élucidé. Une étude comparée de différentes souches de *Botrytis cinerea* et de diverses formes de pourriture du tissu végétal, ainsi que l'utilisation de molécules marquées, nous permettra sans aucun doute de préciser la localisation des cellules réactives ainsi que les sites de biosynthèse des polyamines et de mieux comprendre l'évolution de l'interaction hôte-parasite dans la modification du métabolisme des polyamines lors d'une attaque par un champignon pathogène.

Remerciements

Les auteurs remercient le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB) pour son soutien financier.

Références

- ALTMAN, A.; FRIEDMAN R.; AMIR D.; LEVIN N.; 1982: Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. In: P. F. WAREING (Ed.): Plant Growth Substances, 483-494. Academic Press, New-York.
- BROQUEDIS, M.; CAUCHOIS, A.; DUBOS, B.; BOUARD, J.; 1993: L'acide abscissique et les polyamines dans les mycéliums d'*Eutypa lata* et dans les feuilles et les grappes de vigne atteintes d'eutypiose. In: Actes du Colloque O.I.L.B., 2-5 mars 1993, Bordeaux, France.
- CLARKE, D. D.; 1982: The accumulation of cinnamic acid amides in the cell walls of potato tissue as an early response to fungal attack. In: R. K. S. WOOD (Ed.): Active Defense Mechanisms in Plants, 321-322. Plenum Press, New-York.
- DONÈCHE, B.; 1987: Etude biochimique de la relation hôte-parasite dans le cas du raisin et de *Botrytis cinerea*. Thèse d'Etat, Université Bordeaux 2, France.

- EVANS, P. T.; MALMBERG, R. L.; 1989: Do polyamines have roles in plant development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 235-269.
- FLORES, H. E.; FILNER P.; 1985: Polyamine catabolism in higher plants: Characterization of pyroline deshydrogenase. *Plant Growth Regul.* **3**, 277-291.
- -; GALSTON, A. W.; 1982: Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* **69**, 701-706.
- -; YOUNG, N. D.; GALSTON, A. W.; 1985: Polyamine metabolism and plant stress. *Cell. Mol. Biol. Plant Stress* **22**, 93-114.
- GALSTON, A. W.; 1983: Polyamines as modulators of plant development. *BioScience* **33**, 382-388.
- -; KAUR-SAWHNEY, R.; 1995: Polyamines as endogenous growth regulators. In: P. J. DAVIES (Ed.): *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*, 158-178. Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- GENY, L.; BROQUEDIS, M.; MARTIN-TANGUY, J.; SOYER, J. P.; BOUARD, J.; 1997: Effects of potassium nutrition on polyamine content of various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 85-92.
- HEBY, O.; 1981: Roles of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* **14**, 1-20.
- MARTIN-TANGUY, J.; 1985: The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regul.* **3**, 381-399.
- PEGG, A. E.; 1988: Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 759-774.
- PUCHEU-PLANTÉ, B.; MERCIER, M.; 1983: Etude ultrastructurale de l'interrelation hôte-parasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea*: Exemple de la pourriture noble en Sauternais. *Can. J. Bot.* **61**, 1785-1797.
- SLOCUM, R. D.; FLORES, H. E.; 1991: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton.
- SMITH, M. A.; DAVIES, J. P.; 1985: Separation and quantification of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol.* **79**, 89-91.
- SMITH, T. A.; 1985: Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 117-143.
- TABOR, C. W.; TABOR, H.; 1985: Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **49**, 81-99.
- WALTERS, D. R.; 1995: Inhibition of polyamines biosynthesis in fungi. *Mycol. Res.* **99**, 129-139.

Received November 7, 2000

