

Développement de substrats bioactifs issus des herbiers d'échouage *zostera* sp., pour la culture légumière hors-sol

Benoit M.¹, Sassi J-F.^{1,2}, Rousset A.³, Letousey P.³, Le Floch G.⁴, Rault P.⁵, Fournier G.⁵,
Goussard N.⁶, Jacob B.³

¹ Centre d'étude et de valorisation des algues (CEVA), Presqu'île de Pen Lan, 22610 Pleubian

² Adresse actuelle : CEA Cadarache, 13108 St Paul lez Durance

³ Algieplus, ZI de Kerantour, 22740 Pleudaniel (entreprise dissoute)

⁴ LUBEM – EA 3882, Université de Bretagne Occidentale, Parvis Blaise Pascal, Technopôle de Brest Iroise 29280 Plouzané

⁵ Savéol, 21 rue du Pont - BP 40, 29470 Plougastel

⁶ Centre de vulgarisation et d'études techniques maraichères de la région d'Orléans (CVETMO), 196 rue des Montaudins, 45560 St-Denis-en-val

Correspondance : maud.benoit@ceva.fr

Résumé

Ce projet porte sur l'évaluation de l'intérêt technique, économique et environnemental d'un nouveau substrat à base d'une herbe marine (zostère, *Zostera noltii*) en le comparant aux produits majoritairement utilisés aujourd'hui dans le domaine de la culture légumière hors-sol, en conditions d'hydroponie. Il s'agit en particulier de tirer avantage d'un actif endogène original et spécifique de la zostère (acide zostérique ou AZ) susceptible de limiter l'amplification des microorganismes phytopathogènes présents dans la rhizosphère en inhibant leur adhésion à la surface des racines et du substrat. Au-delà du développement d'un outil de phytoprotection racinaire naturel, écologiquement et économiquement acceptable, ce projet présente plusieurs facettes qui visent à diminuer le préjudice environnemental induit par la culture intensive hors-sol. En effet, ses objectifs sont aussi d'examiner l'intérêt d'un substrat bioactif pour, d'une part, favoriser le recyclage des eaux de drainage et, d'autre part, améliorer l'efficacité de l'eau et des éléments nutritifs afin de limiter leurs apports. L'utilisation de la zostère pour la fabrication de substrats s'inscrit dans une politique de valorisation d'échouages d'herbiers marins. La disponibilité de la ressource n'est pas un facteur limitant. Les échouages de zostère ramassés pour le seul bassin d'Arcachon sont de 5000 tonnes / an, quantité de matière première permettant une production de 5 millions d'unités de substrats. Au niveau mondial, la surface des herbiers marins, estimée à 6 millions de km², produit 125 millions de tonnes de zostères par an (renouvellement des feuilles, détachement par vents et marées). Un des objectifs de ces travaux était alors de présenter à la filière serriste un support de culture innovant compatible avec la conduite hors-sol, facilement recyclable, apte à la prévention des maladies racinaires, favorable à la qualité sanitaire et au recyclage des eaux de drainage. Ce support de culture innovant a été comparé aux supports traditionnels utilisant la laine de roche ou fibre de coco, en termes d'efficacité et de coût. Le potentiel applicatif du substrat de zostère a été évalué sur deux cultures légumières majeures - tomate et concombre - et les principales maladies racinaires qui leur sont associées. Cet article présentera en détails deux facettes du projet : une partie expérimentale *in vitro* permettant de préciser les modalités d'action des substances actives contenues dans la zostère, et une autre partie expérimentale *in planta* permettant de valider leur efficacité de protection racinaire et leur impact sur les flores microbiennes. L'acquisition de ces nouvelles bases scientifiques a permis la mise en œuvre et l'optimisation de la stratégie à l'échelle de la serre pilote.

Mots-clés: Zostère, acide zostérique, culture hors-sol, pathologies racinaires, substrat de culture, protection intégrée.

Abstract: The potential of the seagrass *Zostera sp.* in soilless vegetable cropping

This project aimed at assessing technical, economic and environmental relevance of a new substrate from marine herb (eelgrass, *Zostera noltii*) by comparing it to the products mainly used today in the field of vegetable soilless hydroponic cropping. It aimed in particular to take advantage of an endogenous asset original and specific of the eelgrass (zosterique acid or AZ) likely to limit the amplification of phytopathogenic microorganisms in the rhizosphere by inhibiting their adhesion to the surface of the roots and the substrate. Beyond the development of a natural root crop tool, environmentally and economically acceptable, this project presented several aspects which aim to reduce the environmental harm induced by the soilless cultivation. Indeed, its objectives were also to consider the potential of a bioactive substrate for, on the one hand, to promote the recycling of drainage water and, secondly, to improve the efficiency of water and nutrient in order to limit their contributions. The use of eelgrass in the manufacture of substrates is part of a policy of valorization of strandings of seagrass. The availability of the resource is not a limiting factor. Stranding of eelgrass picked up in the only basin of Arcachon are 5000 tonnes / year, a raw material for the production of 5 million units of substrates. At the global level, the surface of seagrass, estimated at 6 million km², produces 125 million tonnes of seagrass per year (renewal of the leaves, detached by winds and tides). One objective of this work was to present to the grower industry a substrate from innovative culture compatible with the present soilless cropping, easy to recycle, suitable for the prevention of root diseases, favourable to the sanitary quality and recycling of drainage water. This innovative culture media has been compared to the traditional substrate using Rockwool or coconut fiber, in terms of efficiency and cost. The potential application of the substrate of eelgrass was assessed on two major vegetables - tomato and cucumber - and the main root diseases associated with them. This paper presents in detail two parts of the project: an in vitro experiment to specify the modes of action of the active ingredients contained in the eelgrass, and an in planta experiment to validate their effectiveness in root protection and their impact on the microbial flora. The acquisition of these new scientific bases allowed the implementation and optimization of the strategy across the greenhouse pilot.

Keywords: zostera, zosteric acid, phytoprotection, roots'system, soilless culture

Introduction

Contexte et objectifs du projet

La culture légumière sous abri et sur substrat a connu un essor remarquable sur nos territoires depuis une vingtaine d'années et les systèmes de serres hors-sol comptent parmi les techniques développées après la Seconde Guerre mondiale dans l'objectif d'autosuffisance alimentaire. Ces cultures se définissent comme une technique de production végétale où les plantes effectuent leur cycle complet de production sans que le système racinaire ait été mis en contact avec leur environnement naturel : le sol. Elle représente 8000 ha en Europe et 1600 ha en France, essentiellement consacrés à la tomate et au concombre (Tucker, 2001) Avec les exigences accrues des réglementations environnementales, conjuguées à une crise de confiance des consommateurs envers les produits agricoles cultivés en conditions d'hydroponie, le développement de la culture légumière hors-sol requiert une meilleure prise en compte des alternatives naturelles.

Dans les cultures hors-sol de tomate et de concombre, les maladies racinaires provoquées par les *Pythium* spp. (pourridié pythien, fonte des semis) et les *Fusarium* spp., en particulier *Fusarium oxysporum* (pourriture du pied et des racines, flétrissure fusarienne), représentent un enjeu économique important (koohakan 2004, Rose 2004, Punja 2002, Monnet 2008, FORC 2008). La prépondérance des *Pythium* spp. s'accompagne de pertes en particulier lors des premiers stades de développement des jeunes plantes (Rey 1997). L'espèce majoritaire, *P. dissocotum*, est responsable de pertes atteignant régulièrement 5 à 9% du rendement en culture hors-sol de tomate (Le Floch 2007, Picard 2000).

De plus, l'espèce *P. ultimum* et celle particulièrement virulente *P. aphanidermatum* peuvent occasionner des dégâts majeurs jusqu'à 50% de mortalité en quelques jours en culture de concombre (Brajeul 2001).

La lutte contre ces pathogènes s'appuie surtout sur des méthodes prophylactiques (Lacroix 1998, Lacroix 2003) et ne bénéficie que d'un nombre très restreint de matières actives homologuées (source e-phy). Il n'existe aucun traitement chimique pour le *F. oxysporum* chez le concombre (Profil, 2006, FORC, 2008). Il n'existe pas non plus de cultivars résistants aux *Pythium* (Gravel, 2007). Certaines variétés de tomate possèdent des résistances aux races connues de *F. oxysporum*, mais il existe des possibilités de développement de nouvelles races capables de contrer cette résistance (Profil, 2006). Ainsi, la persistance de certains microorganismes pathogènes, l'apparition régulière de nouveaux agents pathogènes (ex : *Agrobacterium rhizogenes* qui provoque de plus en plus de pertes de rendement sur tomate) et la nécessité du recyclage des eaux de drainage requièrent le développement de nouveaux moyens pour contrôler les maladies racinaires.

Ainsi, l'objectif de ces travaux est l'utilisation d'un substrat de zostère pour la production légumière hors-sol (tomate et concombre) se proposant de répondre à cette problématique.

En effet, la zostère contient une substance originale, l'acide zostérique ou acide *p*-sulfoxy-cinnamique, potentiellement exploitable pour contrôler les microorganismes pathogènes (Figure 1).

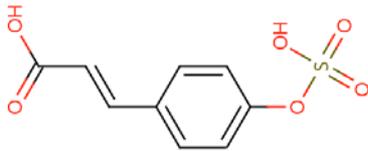


Figure 1 : Structure chimique de l'acide zostérique

Son activité antiadhésive (non biocide) a été mise en évidence vis-à-vis d'une variété d'organismes (virus, bactéries, micro-algues, mollusques marins, champignons) (Todd 1993, Callow 1998, Xu 2005, Xu 2005, Wedge 2000, Stanley 2002, Weidow 2005, Alberte 2007, Mittelman 2008). Les principales perspectives de son application sont les peintures anti-fouling (Todd 1993, Callow 1998 Xu 2005, Xu 2005, Barrios 2005), la santé humaine (Stanley 2002, Weidow 2005, Alberte 2007) et la phyto-protection (Wedge 2000, Stanley 2002). Le potentiel de l'AZ pour la protection des cultures a fait l'objet de quelques publications scientifiques. Il a ainsi été montré un effet antagoniste pour deux maladies foliaires causées par des champignons (anthracnose de la fraise et du haricot, pyriculariose du riz) (Wedge 2000, Stanley 2002). En revanche, le potentiel phyto-protecteur de l'AZ vis-à-vis de pathogènes fongiques du système racinaire n'a pas encore fait l'objet de travaux publiés. L'interaction de l'acide zostérique avec les adhésines fongiques éviterait l'attachement des spores à la surface de leur hôte (Stanley 2002). Or, la fixation des spores est un pré-requis essentiel au développement de la maladie et fait intervenir des mécanismes relativement peu spécifiques et communs parmi les espèces fongiques pathogènes (Tucker 2001). Cette phase du développement fongique constitue donc une cible privilégiée pour la mise au point de moyens de contrôle. La présence naturelle dans la zostère d'une substance apte à contrôler la colonisation microbienne permet alors d'envisager une réduction du recours aux pesticides. Avec le retrait du marché progressif des substances actives disponibles et avec l'apparition accrue de phénomènes de résistance chez les bioagresseurs, le développement de méthodes de protection alternatives devient de plus en plus nécessaire pour garantir la durabilité des moyens de protection.

Les cultures hors-sol offrent plusieurs avantages : le contrôle de la température, de la nutrition, de l'humidité ou de la photopériode. D'autre part, l'irrigation des cultures hors sol se fait par un apport au niveau des collets du plant. Cet apport est ensuite drainé et recyclé (système fermé) ou drainé et rejeté (système ouvert). Mais les réglementations concernant la gestion des effluents des cultures sur substrats, obligent les producteurs à s'orienter vers un système d'irrigation fermé et à adopter le recyclage des eaux de drainage.

En effet, la conduite de cultures hors-sol en conditions de solutions « perdues » génère le rejet d'effluents liquides dans les sols qui représentent un volume de 3000 à 4000 m³ par an et par hectare, chargés de 4 à 10 tonnes d'éléments fertilisants dont environ 1,3 tonnes d'azote sous forme nitrate (Vitré 2002). Le recyclage des eaux de drainage constitue donc un enjeu important face aux problématiques de disponibilité et de qualité des ressources en eau. Il permet une économie d'eau d'environ 30% par rapport à un système en solution perdue (Boulard 2008). C'est également une source d'économie financière pour les professionnels.

Une estimation réalisée en 2002 indique que le gain sur les dépenses liées à la fertilisation est de 0,27 à 0,55€ / m², selon la forme des fertilisants utilisés (Vitré 2002). Cette estimation est aujourd'hui à revoir à la hausse, compte tenu de l'envol du prix des engrais ces dernières années, qui s'est encore traduit par une hausse de 17% pour l'Otex «horticulture et maraîchage» de 2007 à 2008 (Agreste 2009).

Pour désinfecter les eaux de drainage en vue de leur recyclage, les serristes disposent de moyens physiques ou chimiques tels que la thermodésinfection, les UV, l'ozonation ou encore la chloration. Généralement très efficaces (Ehret 2001), ces méthodes présentent des inconvénients tels que les coûts d'investissement et de maintenance, la dépense énergétique, voire la technicité exigée. Elles génèrent par ailleurs un vide sanitaire par définition précaire, car propice à la réinfection rapide par d'éventuels pathogènes peu compétiteurs, comme *Fusarium* et *Pythium* (Vitré 2002, Le Quillec 2006). Parmi les stratégies alternatives actuellement privilégiées, la biofiltration montre une bonne efficacité d'épuration (Tirilly 1998). Elle connaît néanmoins certaines limites : un faible débit de traitement nécessitant la mise en œuvre de dispositifs de stockage et de filtration de taille importante, une diminution significative de la teneur en oxygène dissous, une vulnérabilité aux pollutions et l'incompatibilité avec les traitements phytosanitaires (Le Quillec 2006, Epuration 2005).

Outre le développement d'un outil de phyto-protection, le but de ces travaux était également de diminuer le préjudice environnemental induit par la culture hors-sol, en favorisant le recyclage des eaux de drainage et de limiter les apports des éléments nutritifs.

Enjeux du projet

L'utilisation de la zostère pour la fabrication du substrat s'inscrit dans une politique de valorisation des échouages d'herbiers marins. Ces échouages de zostère ramassés pour le seul bassin d'Arcachon sont de 5 000 tonnes/an, quantité de matière permettant une production de 5 millions de substrats. La valorisation de ces échouages pourrait être une aubaine pour les collectivités chargées de les ramasser et de les traiter.

Un des objectifs de ce projet était de présenter à la filière serriste un support de culture innovant compatible avec la conduite hors-sol, facilement recyclable, apte à la prévention des maladies racinaires, favorable à la qualité sanitaire et au recyclage des eaux de drainage. Ce support de culture innovant a été comparé aux supports traditionnels utilisant la laine de roche ou la fibre de coco, en termes d'efficacité et de coût. Pour cela, le substrat à base de Zostère (herbiers marins) peut constituer une réponse à ce besoin car il est composé d'une matière première naturelle, renouvelable, biodégradable et d'origine française (bassin d'Arcachon).

Partenariat et rôle de chaque partenaire

Le partenariat était constitué de cinq membres, les informations relatives à chacun d'eux sont regroupées dans le Tableau 1.

La diversité et la complémentarité des partenaires répondaient à la pluridisciplinarité du projet. La coordination du projet (action 0) a été assurée par le CEVA (chef de file). La première année du projet (2010) était consacrée à la mise en place de l'outil analytique, afin de doser les composés actifs, dans le but de vérifier l'efficacité de l'AZ sur la prévention des maladies racinaires (Action 1). Pour cela, des essais ont été réalisés afin de démontrer l'effet de l'AZ *in vitro* (Action 2) et *in planta* (Action 3) sur des

champignons pathogènes majeurs et sur le développement de maladies fongiques majeures. Une molécule de référence, l'AZ, a été synthétisée chimiquement et des extraits naturels d'AZ ont été fournis afin de montrer les relations dose-réponse lors de ces tests *in vitro*.

Les deuxième et troisième années (2011 et 2012) étaient dédiées aux tests grandeur nature, des pains de zostère dans des serres de cultures hors-sol pour la production de tomates et de concombre (Action 4). Les objectifs de ces deux années étaient, entre autres, de confirmer la compatibilité des substrats de zostère avec le bon développement des plants, et de démontrer le bénéfice de l'utilisation de ces pains sur la qualité microbiologique des eaux de drainage. Pour ce dernier point, le devenir de l'AZ en culture hors-sol a été particulièrement étudié.

Dans le présent article, seuls les résultats des actions 2 et 3 seront présentés en détail..

| Partenaires | Description |
|---|--|
| 1-CEVA (chef de file) qualifié Institut Technique Agro-Industriel par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Membre de l'ACTIA | Centre ACTIA labellisé ITAI (Institut Technique Agro-Industriel) par le ministère de l'Agriculture et de la pêche. Centre technique dédié depuis 1983 à la valorisation des végétaux marins (algues et plantes halophytes), au travers d'une recherche appliquée, dont le but est l'industrialisation et la création d'une économie liée à la filière algue. |
| 2-SAS ALGIEPLUS | Jeune entreprise des côtes d'Armor créée en avril 2007, dont le but était de valoriser les herbiers de Zostère marins pour l'élaboration de produits au service d'une agriculture durable. |
| 3-Université de Bretagne Occidentale - Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM-EA3882) | Ecole Supérieure de Microbiologie et Sécurité Alimentaire de Brest (ESMISAB). Ce laboratoire universitaire affiche trois axes principaux : 1) Biodiversité des micro-organismes, 2) Ecologie microbienne/structure et fonction des écosystèmes, 3) Ecologie microbienne/dynamisme des populations et des peuplements microbiens. |
| 4-CVETMO Centre de Vulgarisation et d'Etudes Techniques Maraichères de la région d'Orléans | Association créée en 1959 par les producteurs de légumes de l'Orléanais, pour accompagner le développement des maraîchers serristes de la région du Centre-Val-de-Loire, et reconnue depuis 1965 comme station expérimentale régionale, spécialisée en culture sous serre et sous abri. |
| 5-SAVEOL | Créée en 1979, association coopérative agricole regroupant 150 producteurs maraîchers, ce qui représente une surface de production de 200 hectares en tomate (production annuelle de 70 000 tonnes) et 30 hectares en fraise. Savéol possède son propre centre R&D ayant pour objectif de perpétuer l'innovation et le renouvellement des gammes. |

Tableau 1 : Description des partenaires

1. Matériels et méthodes

1.1 Tests *in vitro* des effets de l'AZ sur des micro-organismes pathogènes

L'objectif était d'étudier l'effet de l'acide zostérique (AZ) et d'un extrait de zostère sur certaines étapes du développement de champignons phytopathogènes. Trois paramètres ont été étudiés : **1) l'adhésion des spores, 2) la germination des spores, 3) la croissance du mycélium.**

Les tests ont été réalisés sur les pathogènes principaux du système racinaire de la tomate et du concombre en culture hors-sol : deux souches de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL),

Pythium du groupe F, *Pythium ultimum* (souches fournies par la souchothèque de l'Université de Bretagne Occidentale).

Les expériences ont été réalisées soit avec de l'AZ synthétique soit avec un extrait aqueux de zostère (*Zostera noltii*). Les concentrations en AZ synthétique choisies pour cette étude se rapprochent au maximum de la concentration en AZ dans l'extrait de zostère (0.27% du poids sec soit 0.01% maximum dans un extrait liquide à 5% de matière sèche). De même, les concentrations en extrait choisies pour cette étude ont été calculées en « équivalent AZ ». Ainsi, une gamme de concentrations d'AZ allant de 0.001% à 0.01% a été testée.

1.1.1 Adhésion des spores

Pour tester l'adhésion des spores sur surface biologique, des racicules (jeunes racines de 5 j) de tomate (variété Félicia) sont incubées sous agitation pendant 1h30 dans une solution de spores contenant ou non de l'AZ synthétique (ou de l'extrait de zostère). Après trois rinçages des racines avec l'eau distillée, les racicules sont broyées et le broyat est étalé sur milieu de culture gélosé (PDA). Après 48 heures à l'étuve à 24 °C, **le dénombrement des unités**, formant une colonie permet d'estimer le **taux d'adhésion exprimé en ppm** (Figure 2).

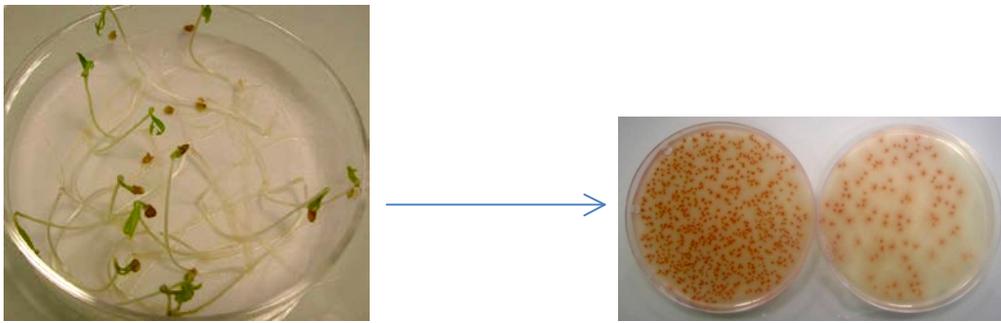


Figure 2 : Incubation des racicules et dénombrement des colonies

1.1.2 Germination des spores

Pour tester l'effet de l'AZ et de l'extrait de zostère sur la germination des spores, des spores non germées sont incubées sous agitation dans un milieu nutritif liquide contenant ou non de l'AZ synthétique (ou de l'extrait de zostère). **Après incubation, les spores germées et non germées sont comptées sous microscope et le pourcentage de germination est calculé.**

1.1.3 Croissance du mycélium

Pour tester l'effet de l'AZ et de l'extrait de zostère sur la croissance du mycélium, le champignon est repiqué sur un milieu gélosé contenant ou non de l'AZ synthétique (ou de l'extrait de zostère). Les boîtes de Pétri sont placées à l'étuve à 24°C et la taille du mycélium est mesurée quotidiennement (Figure 3).

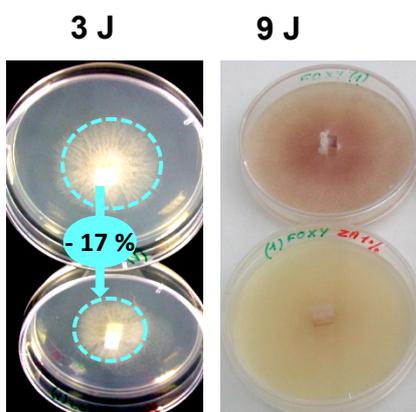


Figure 3 : Croissance du mycélium sur gélose

1.2 Potentiel phytoprotecteur de l'AZ in planta

1.2.1 Matériel fongique

Pour l'isolement et l'entretien de l'agent pathogène, la souche de *Pythium groupe F* utilisée dans cette étude a été isolée à partir de prélèvements racinaires de plants de tomates cultivés sous abris en système hydroponique (région brestoise). Des segments de racines sont placés sur milieu sélectif des *Pythium spp.* La souche identifiée comme étant du *Pythium groupe F* est entretenue en la repiquant toutes les semaines sur le milieu MEA (nb : milieu de culture généraliste, Malt Extract Agar).

La préparation de l'inoculum est effectuée de la façon suivante : des repiquages de la souche isolée sont effectués sur milieu V8 B-sitostérol stimulant la reproduction asexuée des *Pythium*. Puis 20 morceaux de géloses de diamètre 5 mm sont prélevés et mis en boîte de Pétri avec 20 ml d'eau distillée stérile. Après 7-8 heures d'incubation à 25°C, la décharge des zoospores s'observe au microscope à inversion. La solution contenant les zoospores est vortexée afin d'enkyster les spores mobiles et de permettre leur dénombrement à la cellule de Malassez.

1.2.2 Matériel végétal

Les semences utilisées pour l'étude sont de la variété Felicia (Clause, France). La stérilisation des graines se fait en les plaçant dans un bain d'hypochlorite à 10% pendant 10 min puis dans deux bains successifs d'eau distillée stérile pour le rinçage.

Les plants de tomate utilisés pour les essais sont de la variété Felicia et sont achetés chez Avel Plant (Guipavas). Ils sont livrés en motte de 7,5 cm³ et ont été cultivés à une densité de 30 plantes/m² jusqu'à leur livraison. Les plants sont âgés de trois semaines à leur réception et sont utilisés jusqu'à six semaines.

1.2.3 Test de phytotoxicité

L'effet phytotoxique est testé sur deux substrats de germination : le papier filtre et l'agar (0.6 %). Dans une première série de boîtes de Pétri sont déposés trois papiers filtres inondés avec 9 ml d'eau distillée stérile (témoin) additionnée de concentrations d'acide zostérique croissantes : 0,5 g.l⁻¹, 1 g.l⁻¹, 1,5 g.l⁻¹, 2 g.l⁻¹, 10g.l⁻¹. Une seconde série de boîtes de Pétri est préparée avec une solution d'agar à 0,6% autoclavée (témoin) additionnée de concentrations d'acide zostérique croissantes : 0,5 g.l⁻¹, 1 g.l⁻¹, 1,5 g.l⁻¹, 2 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹.

20 graines sont déposées dans chaque boîte de Petri pour toutes les conditions testées. Les boîtes de Petri sont placées à l'étuve à 25°C, à l'obscurité pendant cinq jours. L'eau distillée utilisée pour la manipulation est ajusté au pH 5,5. Après six jours d'incubation, la longueur du système racinaire est mesurée. Trois répétitions du dispositif expérimental ont été réalisées.

1.2.4 Essai en phytotron

Le phytotron est une installation permettant de faire pousser des plantes et de contrôler les conditions environnementales. La photopériode est contrôlée grâce à six néons de 60 watts : 16 h de jour, 8 h de nuit. L'humidité relative et la température sont fixées, respectivement, à 50% et à 24°C. Deux répétitions ont été réalisées.

L'essai en phytotron se déroule sur une semaine. Les plants de tomates sont âgés de 3-4 semaines et sont acclimatés à la culture en hydroponique quelques jours avant l'expérimentation.

La terre située autour des racines est enlevée puis les plants sont placés dans un pot-panier rempli de billes d'argile tamponnée au pH 5,5. 15 litres de solution tamponnée au pH : 5,5 (N : 22 ; P : 10 ; K : 10) circulent en circuit fermé dans le système et un goutteur délivre la solution au collet de chaque plant au débit de 2 litres par heure. Dans l'un des deux dispositifs expérimentaux, de l'acide zostérique est mis

en circulation le 5^{ème} jour. Le lendemain, une inoculation par 500 000 zoospores de *Pythium* spp., est réalisée au collet de chaque plant. L'inoculation des plants se fait à l'aide des zoospores de *Pythium* groupe F obtenues à partir de l'isolat racinaire (Cf matériel fongique). Elle se fait le jour de l'obtention du pathogène en injectant la dose au collet de chaque plant de tomate. Le nombre de zoospores moyen par inoculation est de 300 000.

Le 7^{ème} jour, les racines de tous les plants sont prélevées afin de réaliser un suivi de la colonisation racinaire par les *Pythium* spp.. Le prélèvement des racines se fait en découpant des racines au hasard dans le chevelu racinaire de chaque plant de tomate.

La méthode de détection des *Pythium* spp. est celle du dépôt direct de fragments racinaires sur milieu sélectif des Pythiacées : CMA- PARP. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à l'étuve à 25°C pendant 48 h. Une lecture des boîtes de Pétri permet de connaître le pourcentage de fragments racinaires colonisés par *Pythium* spp. après observation de thalles caractéristiques (Figure 4).

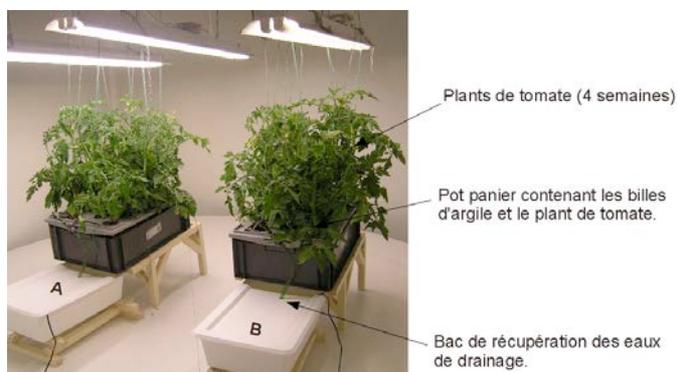


Figure 4 : Système d'irrigation en circuit fermé avec 15 litres de solution nutritive. Une pompe permet le retour de la solution nutritive au collet de la plante et une répartition entre les plants grâce aux goutteurs. Deux modalités expérimentales sont conduites en parallèle A : témoin B : acide zosterique.

2. Résultats et discussion

2.1 Tests *in vitro* des effets de l'AZ sur des microorganismes pathogènes

L'adhésion des spores des deux souches de champignons *Fusarium oxysporum* (FORL) aux racines de tomate est fortement inhibée par l'**extrait de zostère à 1.85%** (équivalent AZ 0.005%). Le taux d'adhésion moyen observé est en effet réduit de **76.9%** (n=3) pour la souche 159 et de **69.6 %** pour la deuxième souche 160. L'extrait de zostère à 0.37% (équivalent AZ 0.001%) n'a pas d'effet sur l'adhésion des spores (n=2) (Figure 5).

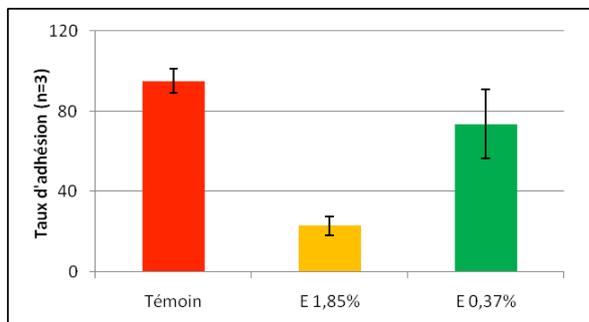


Figure 5: Impact des extraits de zostère sur l'adhésion des champignons FORL

Les expériences réalisées avec l'**AZ synthétique à 0.005%** ne montrent pas de différence significative avec le témoin (n=2). Ainsi, il semble que l'AZ seul n'est pas responsable de l'activité inhibitrice de l'extrait.

Concernant l'effet de l'AZ et des extraits de zostère sur la germination des spores, aucun résultat significatif n'a été observé.

Les croissances des deux souches de champignons FORL sont **fortement inhibées par l'extrait de zostère à 3,7%** (équivalent AZ 0.01%) et **1.85%** (équivalent AZ 0.005%). L'extrait de zostère à 0.37% (équivalent AZ 0.001%) n'a pas d'effet sur la croissance de ces champignons (Figure 6).

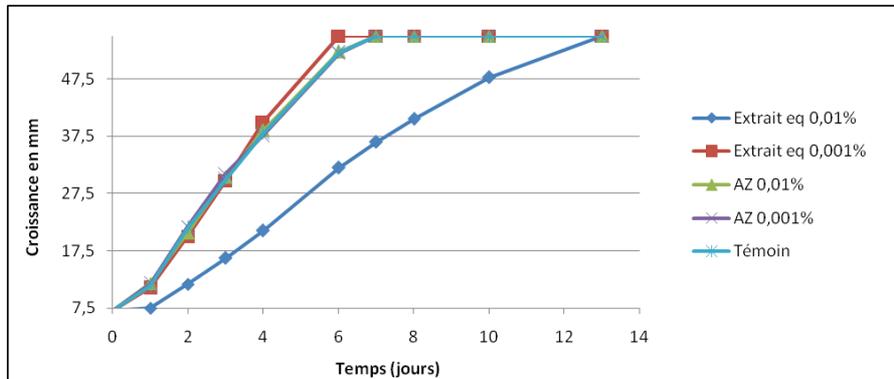


Figure 6 : Impact de l'AZ synthétique et de l'extrait de zostère sur la croissance du champignon FORL 159. Les concentrations testées en AZ synthétique sont 0.01% et 0.001%. Les concentrations testées en extrait de zostère sont 3.7% (équivalent AZ 0.01%) et 0.37% (équivalent AZ 0.001%).

La croissance du champignon *Pythium* groupe F est très **fortement inhibée par l'extrait de zostère à 3.7%** (équivalent AZ 0.01%). On note, en effet, 100% d'inhibition de la croissance jusqu'au 9^{ème} jour de culture (n=3). De même, l'extrait à 1.85% (équivalent AZ 0.005%) réduit fortement la croissance du champignon (Figure 7). La croissance moyenne est ainsi réduite de 66.9% par l'extrait à 1.85% (n=2). L'extrait de zostère à 0.37% (équivalent AZ 0.001%) n'a pas d'effet sur la croissance du champignon

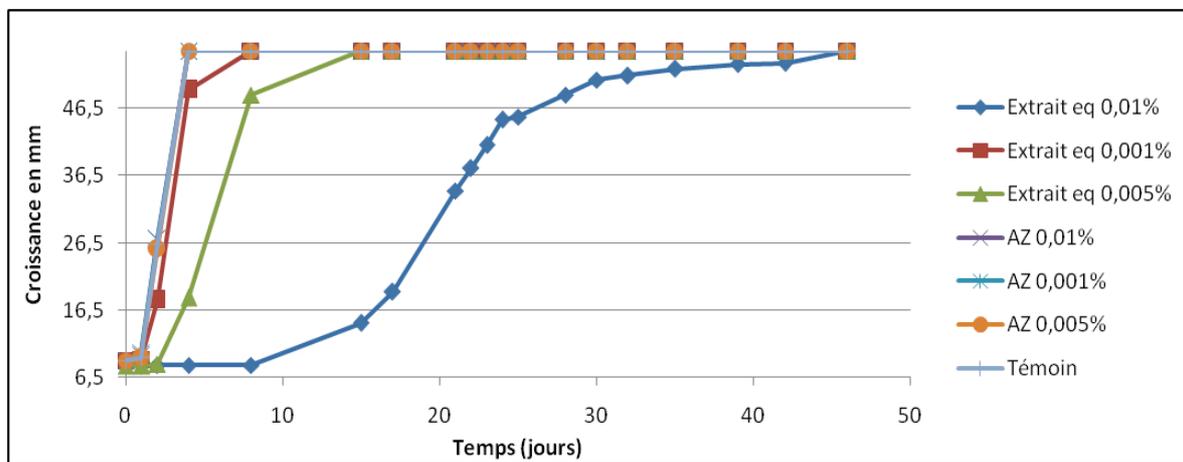


Figure 7 : Impact de l'AZ synthétique et de l'extrait de zostère sur la croissance du champignon *Pythium* groupe F. Les concentrations testées en AZ synthétique sont 0.01%, 0.005% et 0.001%. Les concentrations testées en extrait de zostère sont 3.7% (équivalent AZ 0.01%), 1.85% (équivalent AZ 0.005%) et 0.37% (équivalent AZ 0.001%).

Enfin, la croissance du champignon *Pythium ultimum* est très **fortement inhibée par l'extrait de zostère à 3.7%** (équivalent AZ 0.01%) (Figure 8). On note, en effet, 100% d'inhibition de la croissance jusqu'au 3^{ème} jour de culture (n=3). De même, l'extrait à 1.85% (équivalent AZ 0.005%) réduit fortement la croissance du champignon. La croissance moyenne est réduite de 58.3% par l'extrait à 1.85% (n=2). L'extrait de zostère à 0.37% (équivalent AZ 0.001%) n'a pas d'effet sur la croissance du champignon.

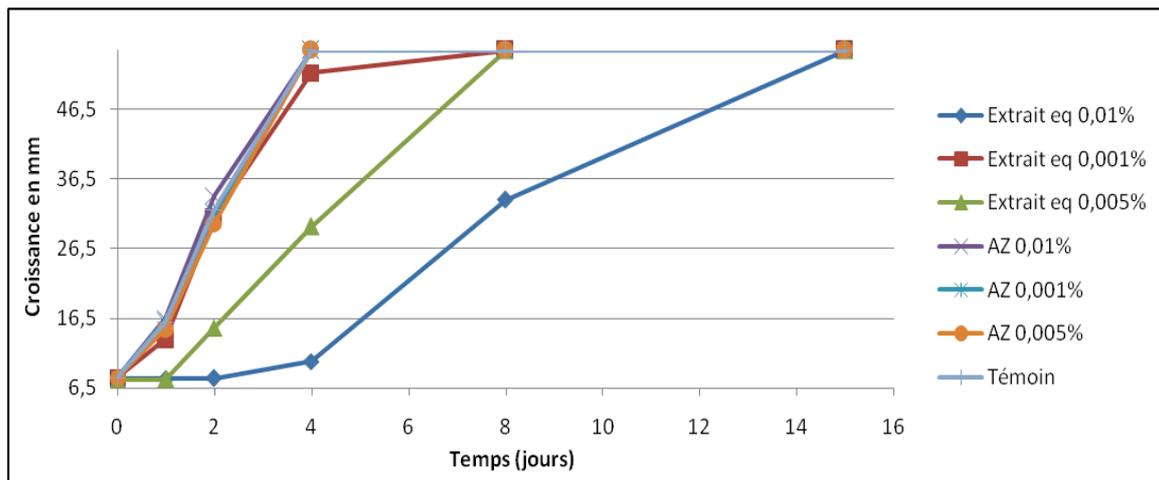


Figure 8 : Impact de l'AZ synthétique et de l'extrait de zostère sur la croissance du champignon *Pythium ultimum*. Les concentrations testées en AZ synthétique sont 0.01%, 0.005% et 0.001%. Les concentrations testées en extrait de zostère sont 3.7% (équivalent AZ 0.01%), 1.85% (équivalent AZ 0.005%) et 0.37% (équivalent AZ 0.001%).

Les expériences réalisées avec l'AZ synthétique à 0.01% et 0.001% ne montrent pas de différence significative avec le témoin, et donc ne perturbent en rien la croissance des différents champignons testés.

En conclusion de cette première partie, l'extrait de zostère diminue fortement le développement des quatre champignons étudiés, cette diminution étant proportionnelle à la concentration en extrait (effet dose). Pour les *Fusarium*, l'extrait réduit l'adhésion des spores et la croissance du mycélium. De même, la croissance des *Pythium* est fortement inhibée par l'extrait de zostère. L'impact de l'extrait sur l'adhésion des spores des *Pythium* n'a pas pu être testé. En revanche, l'extrait de zostère n'a aucun effet sur la germination des spores fongiques, pour les concentrations testées allant de 0.37% à 3.7% d'extrait (soit en équivalent AZ 0.001% à 0.01%).

D'autre part, l'**acide zostérique** de synthèse n'a aucun impact sur le développement des champignons étudiés, pour les concentrations testées allant de 0.001% à 0.01%. Cette gamme de concentrations en AZ correspondant à celle contenue dans l'extrait de zostère, **l'activité biologique de l'extrait ne peut pas être attribuée à l'acide zostérique seul**. Ainsi, cette activité biologique est conférée par d'autres molécules ou par une synergie de l'acide zostérique avec d'autres molécules. Les résultats obtenus avec l'AZ synthétique sont cohérents avec ceux publiés par (Stanley 2002) : 0.1% d'AZ sont nécessaires pour limiter l'adhésion des spores du champignon *Magnaporthe grisea* et une concentration de 1% d'AZ est nécessaire pour inhiber la germination et la croissance de ce champignon.

Sur la base des essais croissance, l'extrait aqueux de zostère est plus actif sur les *Pythium* que sur les *Fusarium*, et notamment sur le *Pythium* du groupe F. Aussi, **le pathogène racinaire choisi pour l'infestation de plantes** est un champignon du genre *Pythium*, et si possible appartenant au groupe F. De plus, cette étude nous permet de définir les concentrations en extrait de zostère à tester dans l'action 3 : elles seront **supérieures à 0.37%**. De même, les concentrations en AZ à tester dans l'action 3 seront supérieures ou égales à 0.01%.

2.2 Potentiel phyto-protecteur de l'AZ in planta

2.2.1 Tests de phytotoxicité

La comparaison des substrats de germination, papier filtre et agar (0,6 %), nous permet de présenter les résultats suivants : nous remarquons que la longueur des racelles du témoin négatif du substrat

papier filtre n'est pas significativement différente de celle de l'agar (0,6%). En effet, le test d'étendue multiple de Newman-Keuls ne différencie pas significativement ces deux moyennes. Il en est de même pour les résultats à 0,5 g.l⁻¹, 1 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹ et pour le témoin positif (Figure 9).

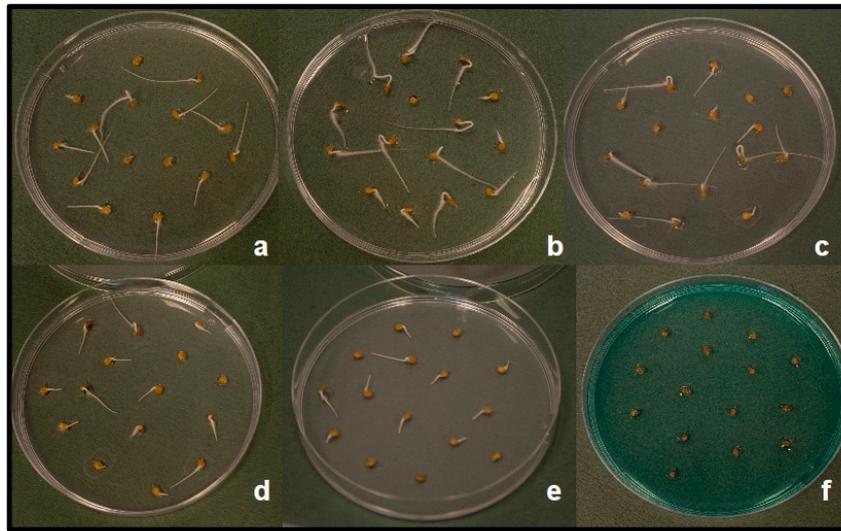


Figure 10 : Test de phytotoxicité de l'Acide Zostérique avec substrat de germination agar (0,6%). Le test de germination est réalisé sur des graines de tomate de la variété Félicia selon la méthode Di Salvatore et al. (2008). a : témoin négatif ; b : 0,5 g.l⁻¹ d'Acide Zostérique; c : 1 g.l⁻¹ d'AZ; d : 1,5 g.l⁻¹ d'AZ ; e : 2 g.l⁻¹ d'AZ ; f : témoin positif.

Afin d'évaluer la phytotoxicité de l'acide zostérique, nous avons choisi pour modèle l'inhibition de la germination de la semence de tomate mise en contact avec différentes concentrations d'acide zostérique et ceci sur deux substrats de germinations différents (papier filtre et agar 0,6%). Nos résultats ne montrent pas une telle différence entre les deux substrats. Cependant, une différence statistiquement significative entre l'agar (0,6%) et le papier filtre est observée pour les concentrations à 1,5 g.l⁻¹ et 2 g.l⁻¹. Pour les autres modalités, toutes les longueurs moyennes de racicelle sont significativement égales entre les deux substrats.

D'autre part, quel que soit le substrat, nous remarquons une diminution significative de la germination à partir de 1,5 g.l⁻¹ qui se confirme à 2 g.l⁻¹. Nous pouvons donc dire qu'il y a effet phytotoxique de la molécule à partir de la concentration 1,5 g.l⁻¹. Une absence totale de germination est observée à partir de la concentration à 10 g.l⁻¹, ce qui montre un effet fortement phytotoxique, à l'équivalence du cuivre, de l'acide zostérique à cette concentration.

Une phytotoxicité du produit testé a donc bien été démontrée. Cependant, les concentrations testées sont supérieures à celles relarguées dans un substrat de zostère. C'est pourquoi, ces résultats sont à pondérer : les concentrations d'acide zostérique naturellement présentes dans un substrat de zostère ne sont pas phytotoxiques.

Néanmoins, un éventuel traitement préventif à l'acide zostérique sur les racines du plant de tomate devra prendre en compte ce risque de phytotoxicité. Désormais, nous pouvons dire que le traitement ne devra pas dépasser une concentration de 1 g.l⁻¹. Il faut préciser que l'acide zostérique sera additionné dans des pains de culture sur des plantes âgées et non des graines en germination.

2.2.2 Évaluation de l'effet d'un traitement préventif par acide zostérique (essai en phytotron)

La Figure 10 présente les résultats obtenus lors de l'essai en phytotron (moyenne de deux répétitions) et illustre l'activité anti-adhésive (comparée à un témoin) pour chaque traitement (acide zostérique à différentes concentrations). Plus la concentration en acide zostérique est élevée et plus la

contamination racinaire est faible. Cela signifie que l'efficacité du traitement contre les *Pythium spp.* est proportionnelle à la concentration en AZ appliquée dans la solution nutritive. La solution de composés phénoliques CP à 2.5 g.l⁻¹ (solution contenant de l'acide zostérique naturel) semble encore plus efficace, montrant une synergie des composés phénoliques pour diminuer la contamination racinaire par le champignon pathogène (résultats non montrés).

Seule la concentration en AZ à 1 g.l⁻¹ présente une activité antiadhésive significative par rapport au témoin. Ce traitement semble donc efficace mais la contamination reste néanmoins élevée, une augmentation de la teneur en AZ à plus de 1 g.l⁻¹ n'étant pas possible (limite de toxicité pour la tomate).

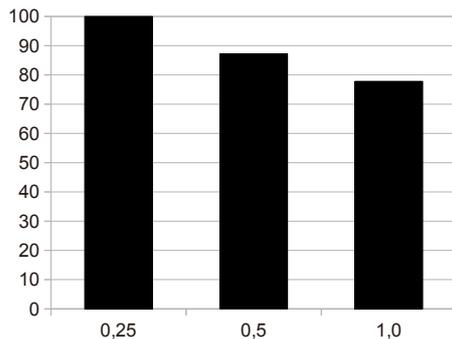


Figure 10 : Évaluation de l'effet anti-adhésif d'un traitement préventif par l'acide zostérique. En abscisse, les concentrations en AZ sont exprimées en g.l⁻¹). Le pourcentage de colonisation racinaire en *Pythium spp.* est présenté en ordonnée. La moyenne de deux répétitions sont représentées et l'astérisque indique une différence significative de colonisation par rapport au témoin sans acide zostérique.

Conclusion

Les résultats de l'action 2 suggèrent que les substrats de zostère peuvent avoir un intérêt sanitaire pour la culture légumière hors-sol. Tout d'abord, l'AZ contenu ou relargué par ces substrats peut avoir un impact sur la flore fongique si **la concentration en AZ est supérieure à 0.01%** (soit 100 ppm dans les substrats ou 0.1 gramme par litre d'eau de drainage). De plus, grâce au test de phytotoxicité réalisé *in vitro*, dans le cadre de l'action 3, notre étude a permis de **préciser la dose maximale** d'acide zostérique tolérable par la plante. **La concentration à 1 g.l⁻¹** est la plus faible concentration testée, montrant une **activité anti-adhésive** et capable d'inhiber la germination de plants de tomates. Ces données ont donc été vérifiées en serre de production grandeur nature dans le cadre de l'action 4 (quantification de l'AZ dans les eaux de drainage et dans les racines + substrat).

Deuxièmement, d'autres molécules issues de la zostère sont efficaces pour limiter le développement de la flore fongique, comme l'indiquent les résultats obtenus avec l'extrait de zostère. Ces molécules peuvent, comme l'AZ, être contenues ou relarguées par les substrats et ainsi conférer une protection au système racinaire des plantes cultivées et maintenir une qualité microbiologique des eaux de drainage compatible avec leur recyclage. Troisièmement, les cultures sur substrats de zostère (mais aussi sur laine de roche et fibres de coco) peuvent être traitées avec un extrait de zostère *via* les solutions nutritives. Cette approche a été réalisée grandeur nature au cours de l'année 2012 (action 4 du projet).

Suite à ces résultats, les actions qui ont suivi ont permis de réaliser un suivi comparatif en serre de production de la flore racinaire de *Pythium spp.* chez les plantes cultivées sur substrat de fibre de coco et sur substrat de zostère permettant d'évaluer l'effet de cette plante aquatique sur la qualité sanitaire des plants.

En résumé, la première année (2011) a été consacrée à la comparaison entre les cultures sur pains de zostère et les cultures sur substrats « laine de roche » ou « fibre de coco ». Très peu de différences ont été notées en termes de rendement de la récolte. Concernant l'aspect des plants, les feuilles produites sur les pains de zostère se sont révélées plus courtes. Ensuite, la deuxième année (2012) a été consacrée à la vérification de l'intérêt agronomique de l'injection de l'AZ dans les solutions nutritives. Il semblerait donc que l'apport d'AZ génère une amélioration au niveau de la productivité des plants.

Malgré ces résultats, sur le plan environnemental, en comparaison aux produits majoritairement utilisés en cultures légumières, le substrat de zostère présente un bilan écologique plus favorable : une matière première locale, renouvelable, facilement recyclable après la saison culturale (amendement, compostage), dont le procédé de fabrication consiste à amalgamer de façon mécanique les fibres sèches de l'herbe marine (JF Sassi 2006). La laine de roche, principal substrat concurrent, est caractérisée par une production énergivore (fonte du basalte à 1500-2000°C), par l'utilisation de résines d'encollage d'origine chimique et par des débouchés de fin de vie quasi-inexistants. La facilité de traitement en fin de vie est un critère important pour le choix des supports de culture hors-sol, qui représentent chaque année un volume de 100 à 125 m³ par hectare. La fibre de coco, quoique biodégradable et issue de ressources renouvelables, n'est pas pour autant une alternative véritablement satisfaisante, du fait de l'éloignement des sites de production (Asie du Sud-Est) et des traitements de désinfection (fumigation, rayonnement ionisant) nécessaires à son importation. Elle présente, par ailleurs, une variabilité qualitative très marquée en fonction de son origine.

Références bibliographiques

- Agreste infos rapides. 2009. Moyens de production. Ministère de l'Agriculture et de la pêche, n° 2/10, 4 pp.
- Alberte R.S., Roschek B. Jr., Mittelman M.W., 2007. Inhibition of biofilm formation by zosteric acid and related combinatorial chemistries. GTC-bio Anti-infectives Conference, 25-26 January 2007, San Francisco.
- Barrios C.A, Xu Q., Cutright T., Newby B.M.Z., 2005. Incorporating zosteric acid into silicone coatings to achieve its slow release while reducing fresh water bacterial attachment. *Colloids Surfaces B*. 41, 83-93.
- Boulard T., 2008. Scénarios d'évolution des productions légumières sous serre. Forum Recherche-Partenariat « Risques phytosanitaires émergents », 10-11 mars 2008, Montpellier.
- Brajeul E., Javoy M., Pelletier B., Letard M., 2001. Le concombre. Monographie CTIFL, Ed CTIFL, 349 pp.
- Callow M.E., Callow J.A., 1998. Attachment of zoospores of the fouling alga *Enteromorpha* in the presence of zosteric acid. *Biofouling* 13, 87-95.
- Ehret D.L., Alsanus B., Wohanka W., Menzies J.G., Utkhede R., 2001. Disinfestation of recirculating nutrient solutions in greenhouse horticulture. *Agronomie*, 21 : 323-339.
- Epuration des eaux de drainage par biofiltration. 2005. *Le Point Sur*, publication du CTIFL, 4 pp.
- FORC Expérimentation FORC. 2008. Présentation lors de la journée technique Hortifibre. La Florentaise, 13 pp.
- Gravel V., 2007. Lutte contre *Pythium ultimum* chez la tomate de serre : une approche microbienne. Thèse de Doctorat, Université Laval, Québec, 152 pp.
- Koohakan P., Ikeda H., Jeanaksorn T., Tojo M., Kusakari S.I., Okada K., Sato S., 2004. Evaluation of the indigenous microorganisms in soilless culture: occurrence and quantitative characteristics in the different growing systems. *Sci. Hort.* 101, 179-188.
- Lacroix M., 1998. Système racinaire de la tomate de serre, champignons phytopathogènes et environnement. Rapport du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, 16 pp.
- Lacroix M., 2003. Principales maladies fongiques responsables de chancre sur la tige et au collet du concombre de serre. Rapport du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, 11 pp.
- Le Floch G., Tambong J.T., Vallance J., Tirilly Y., Lévesque C.A., Rey P., 2007. Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA microarray and real-time PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 317-326.

- Le Quillec S., 2006. Potentialités de la protection biologique contre les pathogènes racinaires en culture hors-sol. SIVAL, productions légumières : les nouveaux enjeux phytosanitaires, 19 janvier 2006, Angers.
- Les études et expérimentations techniques qualité et environnement en production. 2007. Rapport CTIFL, 42 pp.
- Mittelman M., 2008. *In vitro* and *in vivo* microbial adhesion inhibition mediated by CF-238, a novel and non-toxic bis-phenolic small molecule obtained from a combinatorial library. 5th Anti-Infectives Partnering & Deal-Making Summit, 5-7 March 2008, Philadelphia, PA.
- Monnet Y., 2008. Incidence des maladies des cucurbitacées en France (melon, concombre, courgette, cornichon). *EPPO Bulletin*, 30 : 205-208.
- Picard K., 2000. Lutte biologique par *Pythium oligandrum* en cultures hors sol : dynamique des populations, antagonisme et rôle d'une protéine dans l'induction de résistance chez la tomate. Thèse de Doctorat, UBO, 162 pp.
- Profil de la culture des tomates de serre au Canada. 2006. Etude réalisée par Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre pour la lutte anti-parasitaire et Programme de réduction des risques liés aux pesticides. 50 pp.
- Punja Z.K., Rose S., Yip R., 2002. Biological control of root diseases. Canadian Greenhouse Conference, 9 October 2002, Toronto, Canada.
- Rey P., Nodet P., Tirilly Y., 1997. *Pythium* F induces a minor but ubiquitous disease in tomato soilless cultures. *J. Plant Pathol.* 79, 173-180.
- Rose S., Yip R., Punja Z.K., 2004. Biological control of *Fusarium* and *Pythium* root rots on greenhouse cucumbers grown in rockwool. *Acta Hort.* (ISHS) 635, 73-78.
- Sassi J.F., Jacob B., Le Deit H., 2006. Utilisation d'herbes aquatiques à titre de support de culture hors-sol et support ainsi constitué. Brevet FR 06/10471 (30/11/2006).
- Stanley M.S., Callow M.E., Perry R., Alberte R.S., Smith R., Callow J.A., 2002. Inhibition of fungal spore adhesion by zosteric acid as the basis for a novel, nontoxic crop protection technology. *Phytopathology* 92, 378-83.
- Tirilly Y., Déniel F., 1998. La filtration lente comme moyen de désinfection. *PMH-Revue Horticole* 396, 30.
- Todd J.S., Zimmerman R.C., Crews P., Alberte R.S., 1993. The antifouling activity of natural and synthetic phenolic acid sulphate esters. *Phytochemistry* 34, 401-404.
- Tucker S.L., Talbot N.J., 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu.Rev. Phytopathol.* 39, 385-417.
- Vitré A., 2002. Gestion des effluents et déchets des cultures légumières, Résumé de « Gestion des effluents des cultures légumières sur substrat ». Rapport du CTIFL, 4 pp.
- Wedge D.E., Curry K.J., Smith B.J., 2000. Zosteric acid efficacy in control of strawberry anthracnose (*Colletotrichum fragariae*). Southern Division Meeting Abstracts, 5-7 March 2000, Gainesville, Florida.
- Weidow B., Lepuil M., Alberte R., White D.C., Biggerstaff J.P., 2005. Inhibition of bacterial adherence to human lung epithelial cells by a naturally occurring product, zosteric acid and its related compounds. Abstr. 105th Meet. Am. Soc. Microbiol., Atlanta.
- Xu Q., Barrios C.A., Cutright T., Newby B.-M.Z., 2005. Assessment of antifouling effectiveness of two natural product antifoulants by attachment study with freshwater bacteria. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 12, 278-284.
- Xu Q., Barrios C.A., Cutright T., Newby B.-M.Z., 2005. Evaluation of toxicity of capsaicin and zosteric acid and their potential application as antifoulants. *Environ. Toxicol.* 20, 467-474